



# HEMATO-MORPHOLOGY WORKSHOP

Dr. N.V.Shiran

Ph.D of Lab Hematology-SBMU

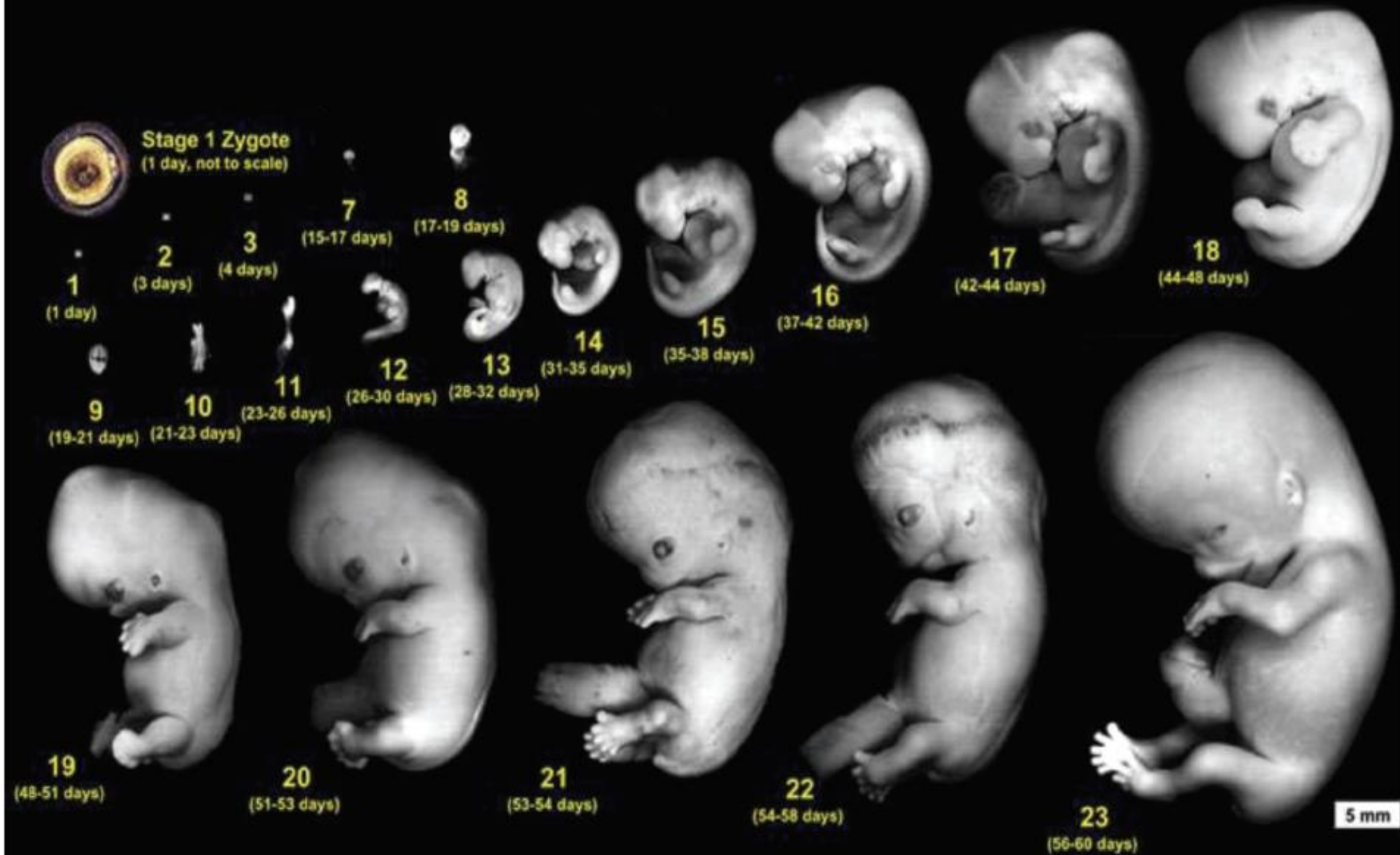
# رئوس مطالب امروز:

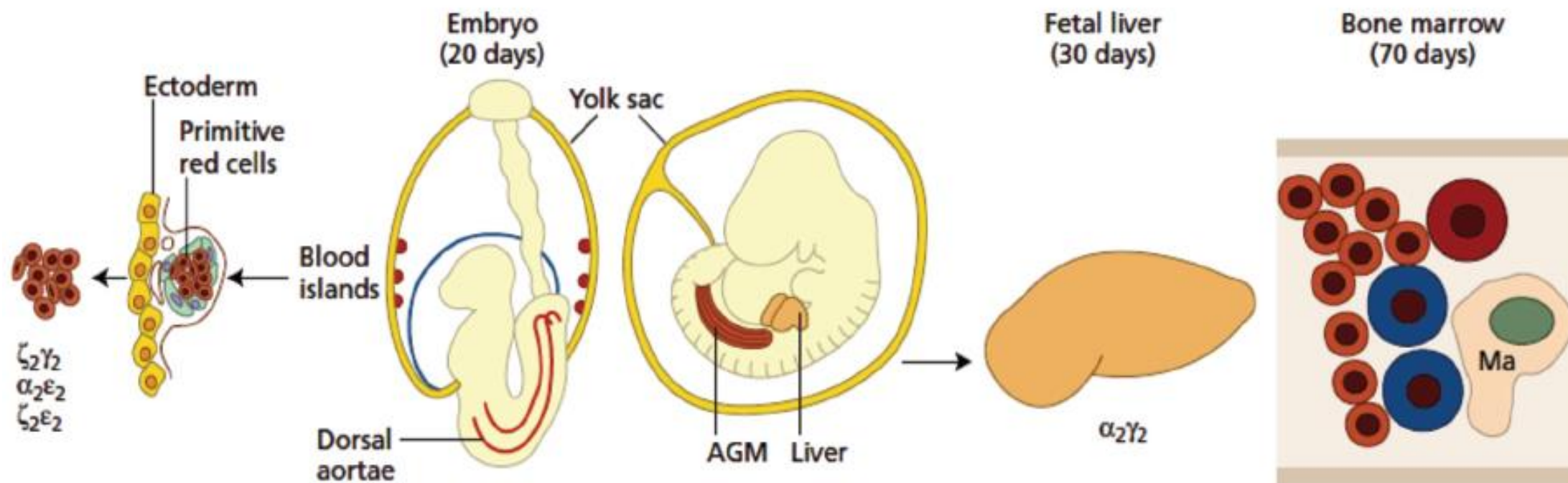
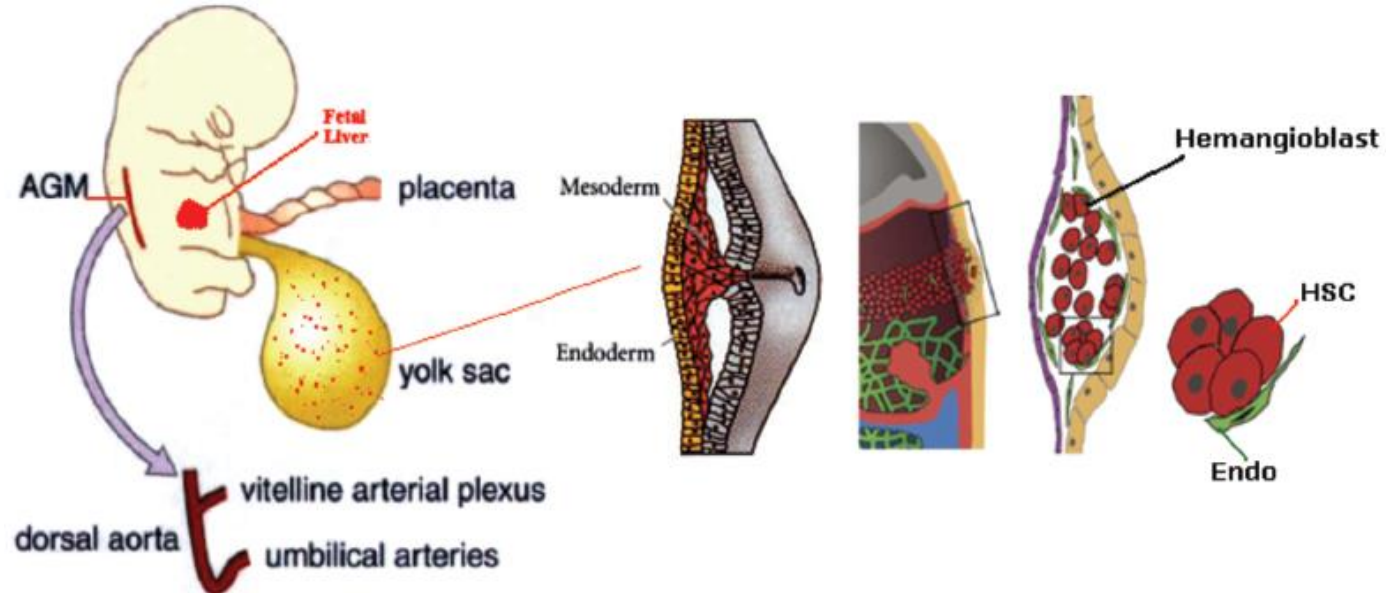


- مکانهای فونسازی
- مخزاستخوان و ارزیابی آن
- رنگ آمیزی
- اریترپوئز و مگاکاریوپوئز  
مورفولوژی پلاکتی
- مورفولوژی اریترئیدی
- گزارش دهی با فرمت ICSH

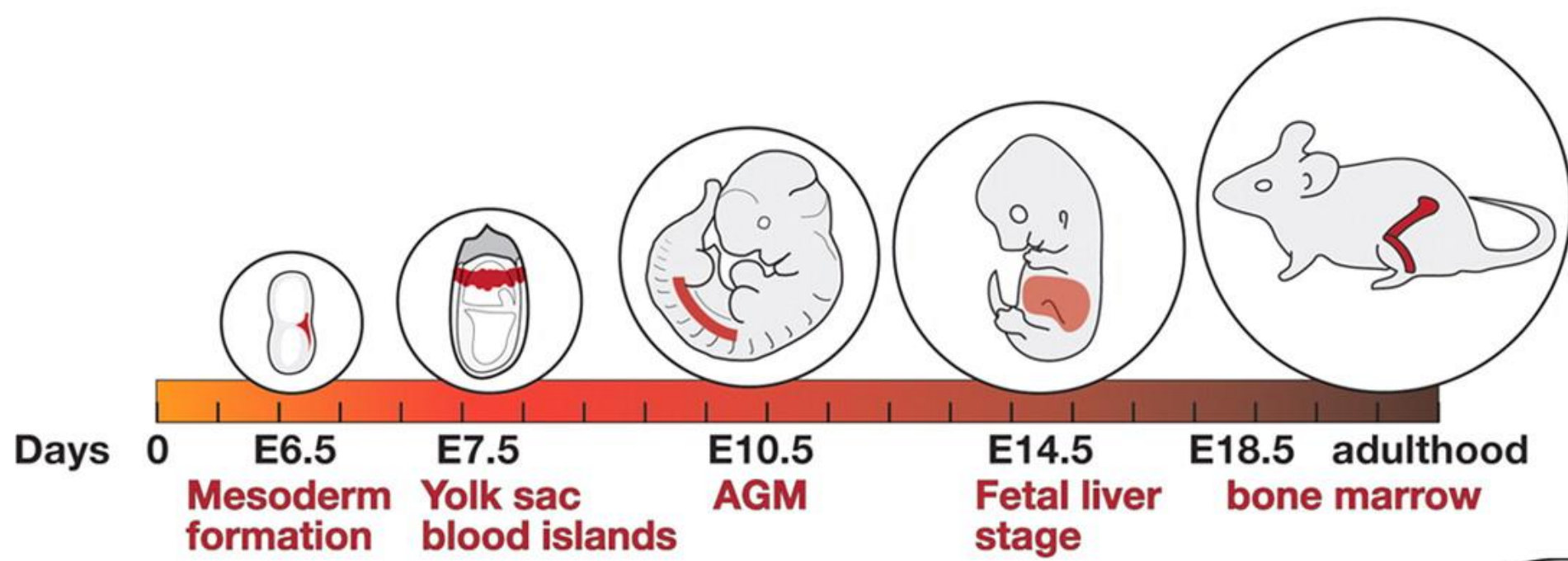
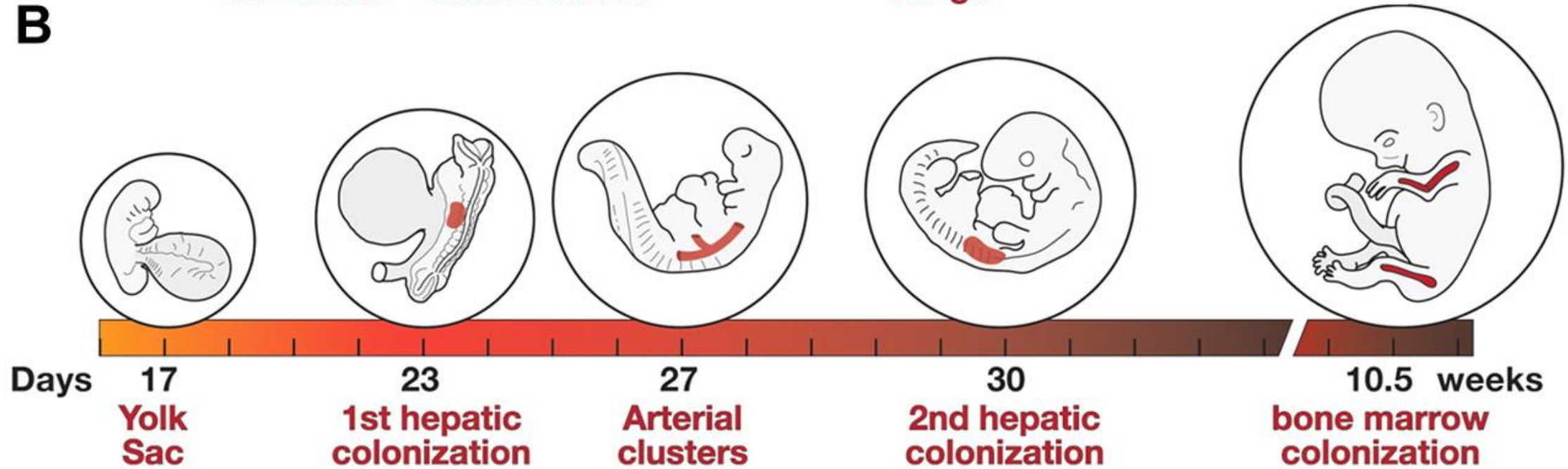
# Hematopoiesis & Stem Cells

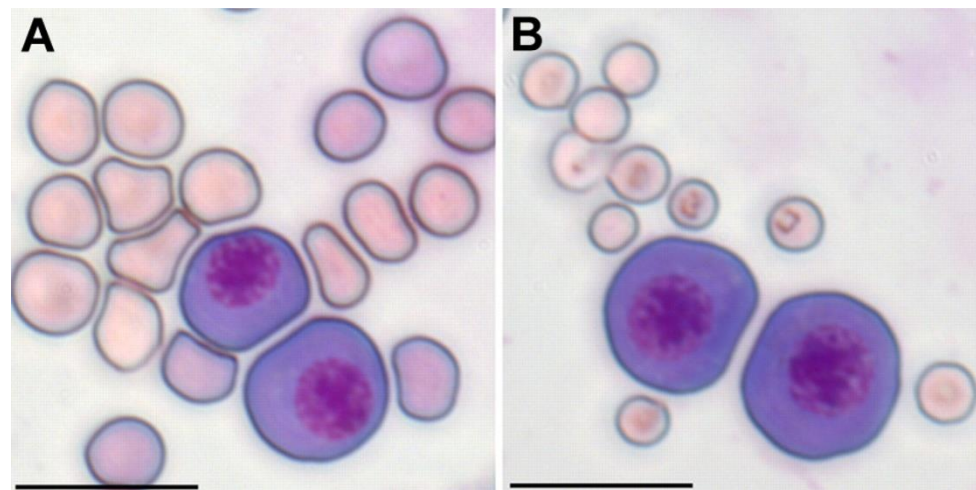
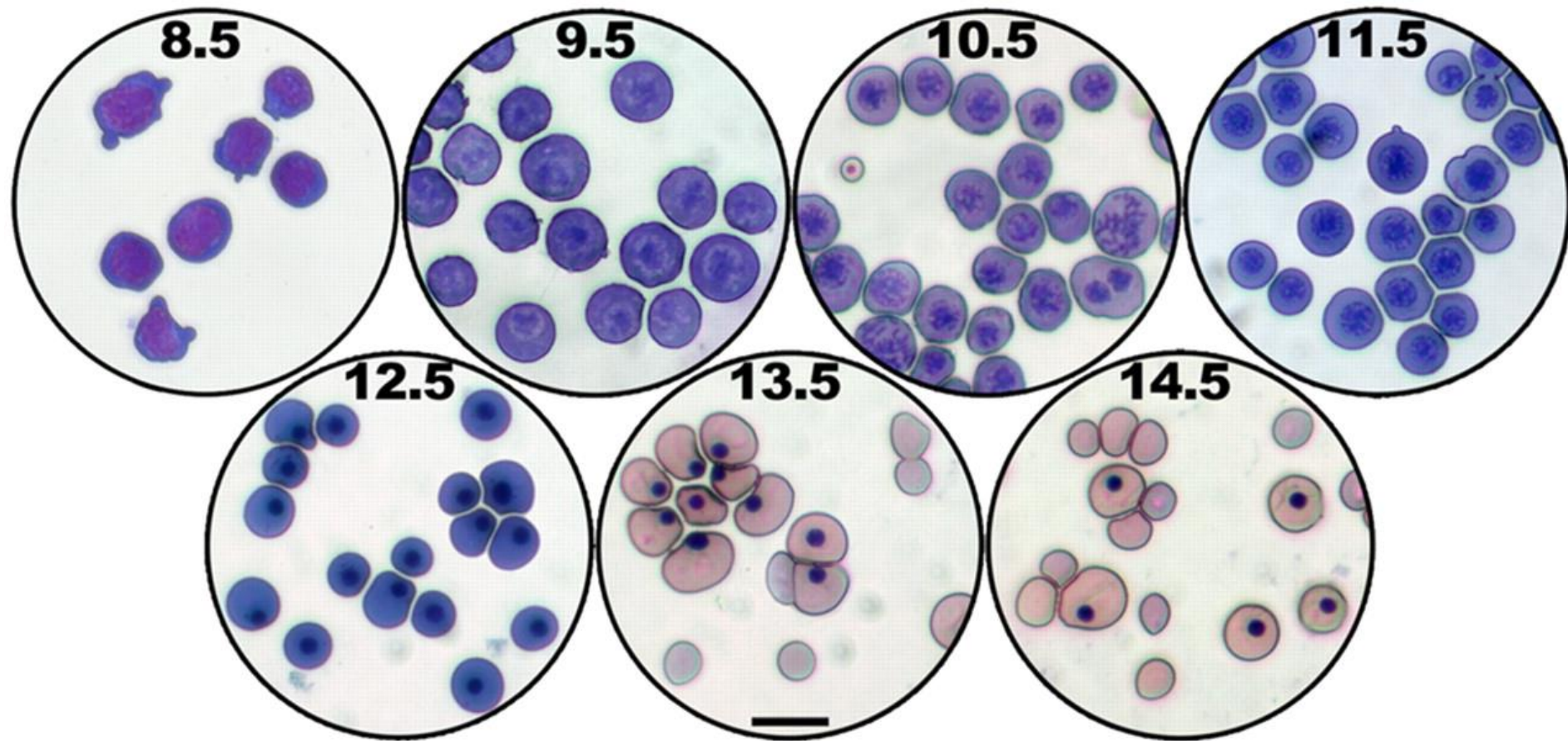
# Carnegie Stages of Human Development





شکل ۵-۱۷: انتقال خون‌سازی رویانی (کیسه زرد، جفت، کوریون، آلتوتویس، PASP/AGM) به خون‌سازی جنینی (کبد، طحال و BM)

**A****B**

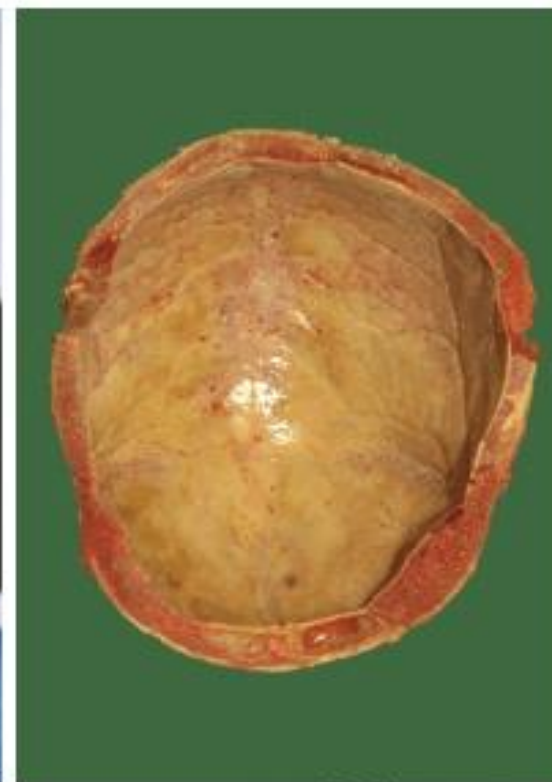


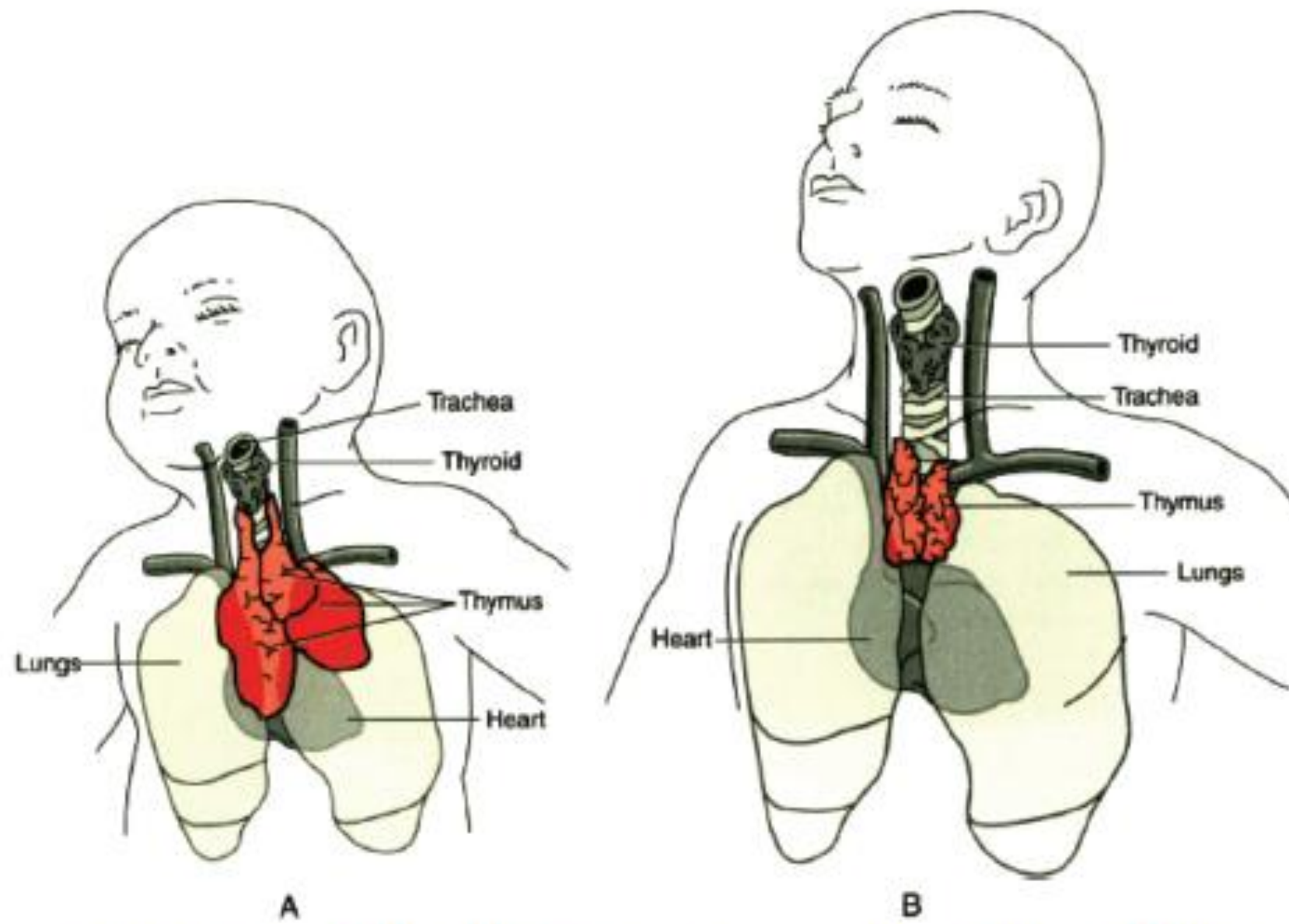
| خون‌سازی نهایی<br>(Definitive)                             |                                                   |                                                                |                                                                | خون‌سازی بدوی<br>(Primitive)                   | خصوصیات            |
|------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|--------------------|
| ۴                                                          |                                                   |                                                                |                                                                | ۱                                              | تعداد مراحل        |
| Adult-Definitive                                           | Meta-Definitive                                   | Meso-Definitive                                                | Pro-Definitive                                                 | مزوبلاستیک                                     | نام مراحل          |
| مغزاستخوان و تا<br>حدودی تیموس                             | کبد جنینی و تا حدودی<br>طحال و تیموس              | AGM<br>و تا حدودی پلاستنا                                      | PASP<br>و تا حدودی پلاستنا*                                    | کیسه زرد (Y.S)                                 | مکان خون‌سازی      |
| از ۴/۵ ماهگی جنینی<br>تا آخر عمر                           | ۱/۵ ماهگی جنینی تا ۲<br>ماه بعد زایمان            | E45-E60<br>رویانی                                              | E30-E50<br>رویانی                                              | E14-E45<br>رویانی                              | زمان خون‌سازی      |
| بعد زایمان                                                 | ۴-۶ ماهگی                                         | E45                                                            | E40                                                            | E25                                            | حداکثر خون‌سازی    |
| پان‌میلوز (همه رده‌ها)                                     | پان‌میلوز (همه رده‌ها) +                          | اریتروئیدی و پلاکتی                                            | اریتروئیدی و پلاکتی                                            | فقط اریتروئیدی                                 | انواع رده‌های خونی |
| خارج عروقی<br>اینترا مدولاری<br>تماماً داخل جنینی          | خارج عروقی<br>اکسترا مدولاری<br>تماماً داخل جنینی | داخل عروقی<br>اکسترا مدولاری<br>داخل رویانی<br>(به جز پلاستنا) | داخل عروقی<br>اکسترا مدولاری<br>داخل رویانی<br>(به جز پلاستنا) | داخل عروقی<br>اکسترا مدولاری<br>خارج رویانی    | نوع خون‌سازی       |
| EPO و Runx-1 و فاکتورهای رونویسی SCL, GATA1/2, LMO2 و ELKF |                                                   |                                                                |                                                                | FLKF, SCL, Lmo-2,<br>GATA1/2, SP-1<br>بدون Epo | فاکتورهای خون‌سازی |
| آلفا و بتا < دلتا و گاما                                   | آلفا و گاما < بتا                                 | زتا، اپسیلون، و مقدار بسیار اندکی آلفا و گاما                  | زتا و اپسیلون                                                  | زتا و اپسیلون                                  | نوع گلوبین         |
| A>A2>F                                                     | F>A                                               | گاور ۱، گاور ۲، پورتلند ۱ و اندکی F                            | گاور-۱                                                         | گاور-۱                                         | نوع هموگلوبین      |
| ۴ ماه                                                      | ۴ ماه                                             | ۵-۶ ماه                                                        | ۵-۶ ماه                                                        | ۵-۶ ماه                                        | عمر RBC            |
| 90fl/30pg                                                  | 100fl/35pg                                        | 300fl/100pg                                                    | 400fl/100pg                                                    | 400fl/100pg                                    | MCV/MCH            |
| ۵٪                                                         | ۷۰٪                                               | ۱۰۰٪                                                           | ۱۰۰٪                                                           | ۱۰۰٪                                           | هسته RBC           |

\* علاوه بر جفت، کوریون و آلانتوئیس نیز در خون‌سازی خارج رویانی کمک می‌کنند.

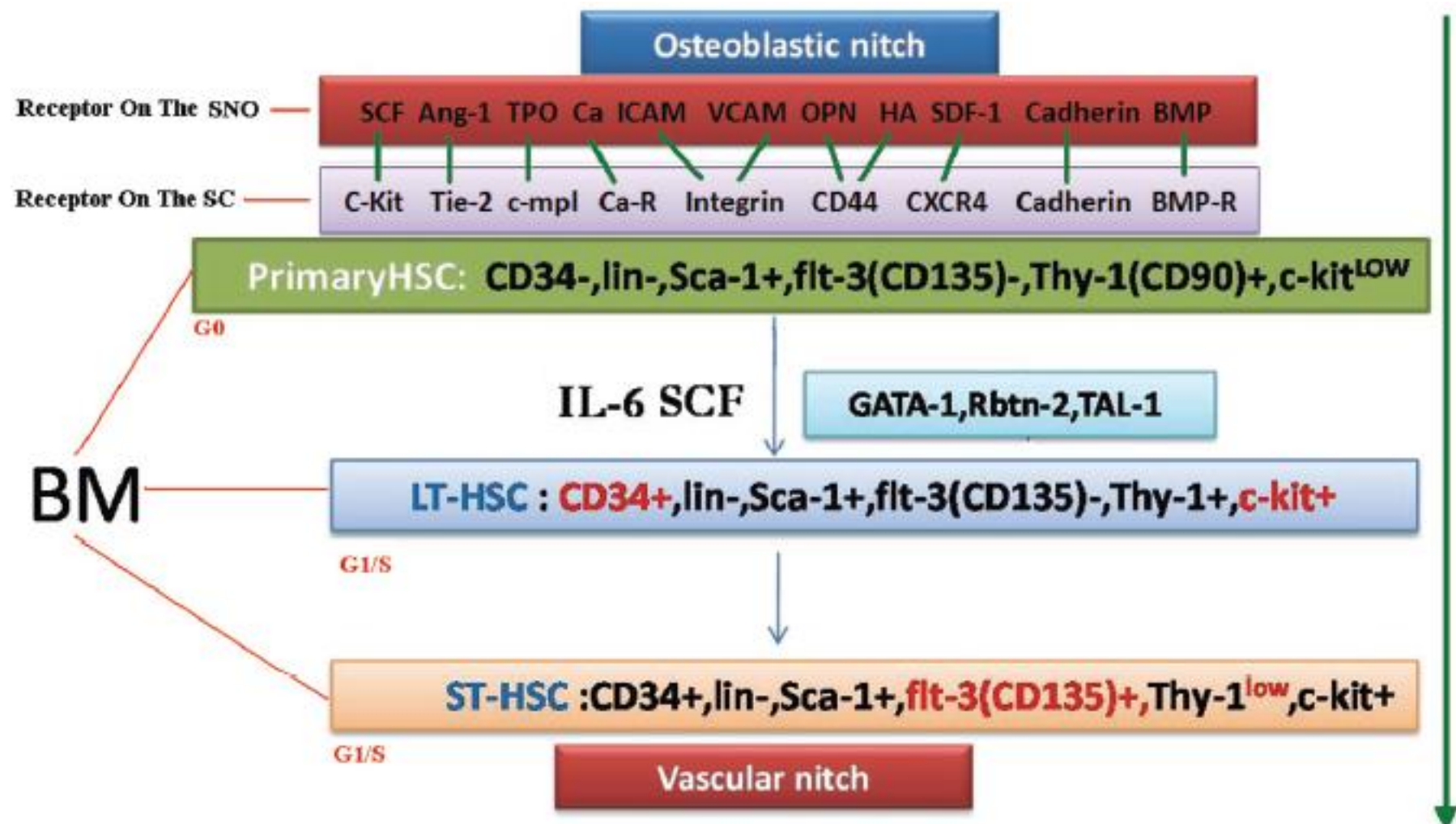
+ همه رده‌ها (لنفوبون، گرانولوبون، اریتروپون و مگاکاریوبون)

CI

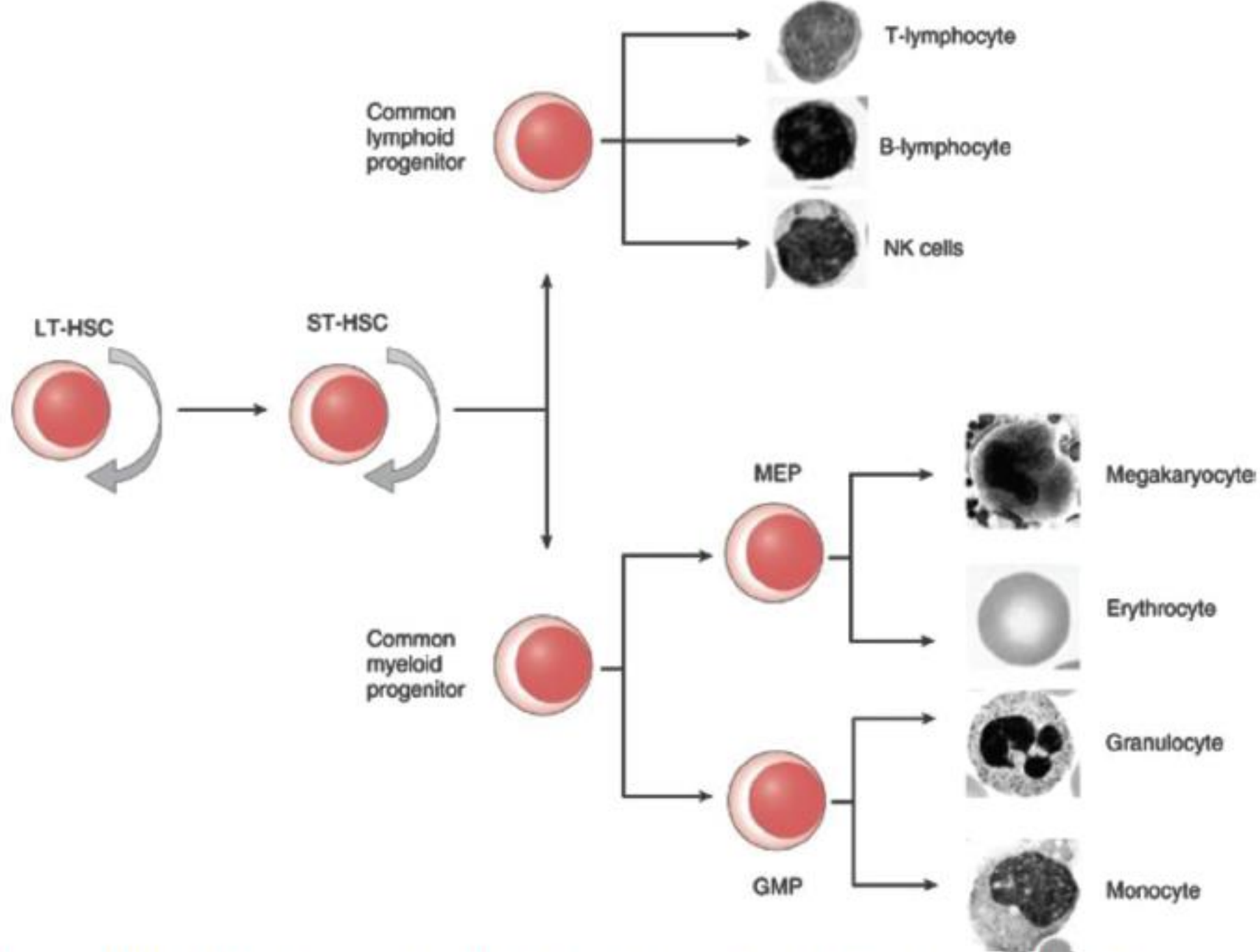




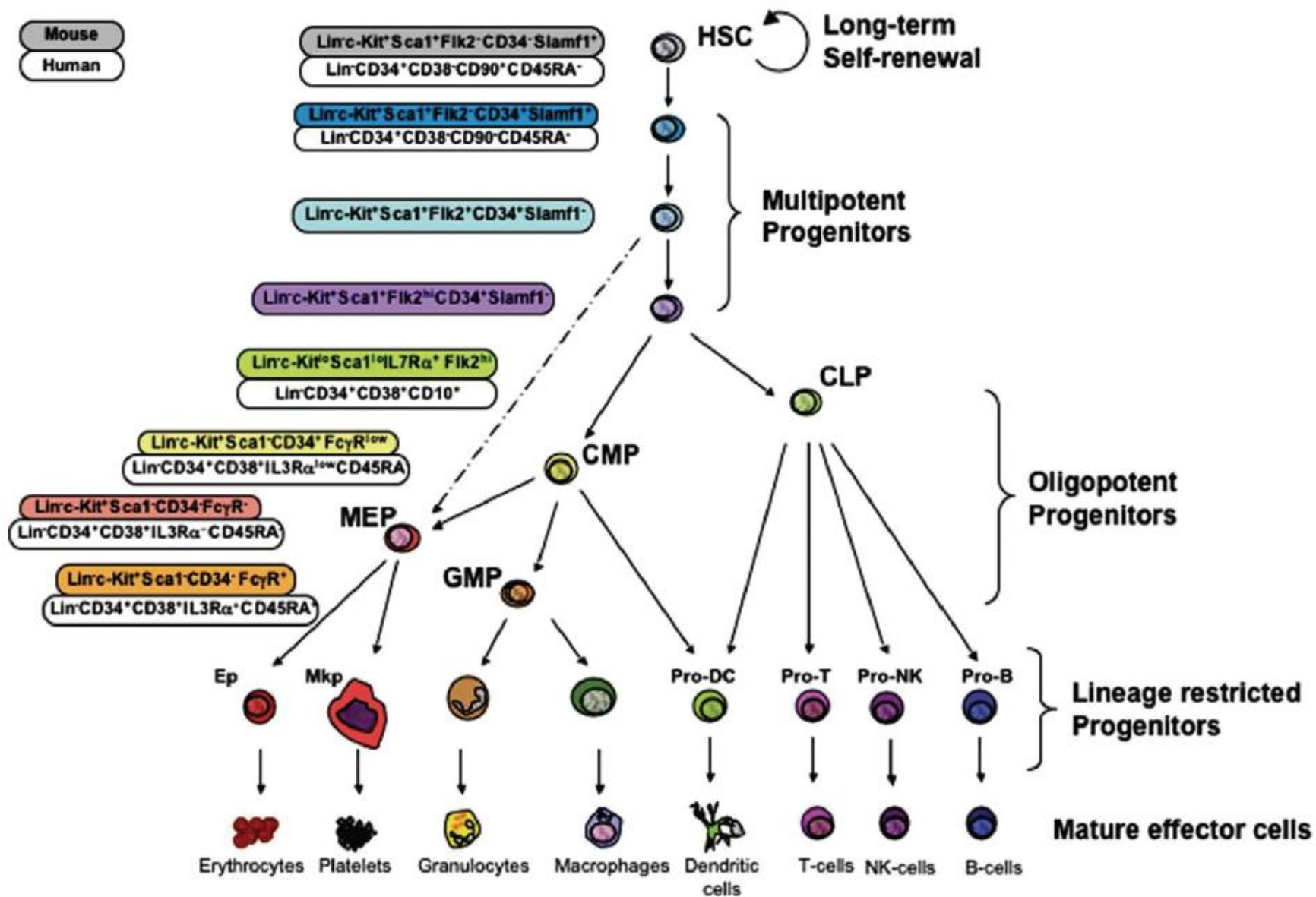
شکل ۱۶-۱۷: تفاوت اندازه تیموس در یک فرد خردسال (A) با یک فرد بالغ (B).

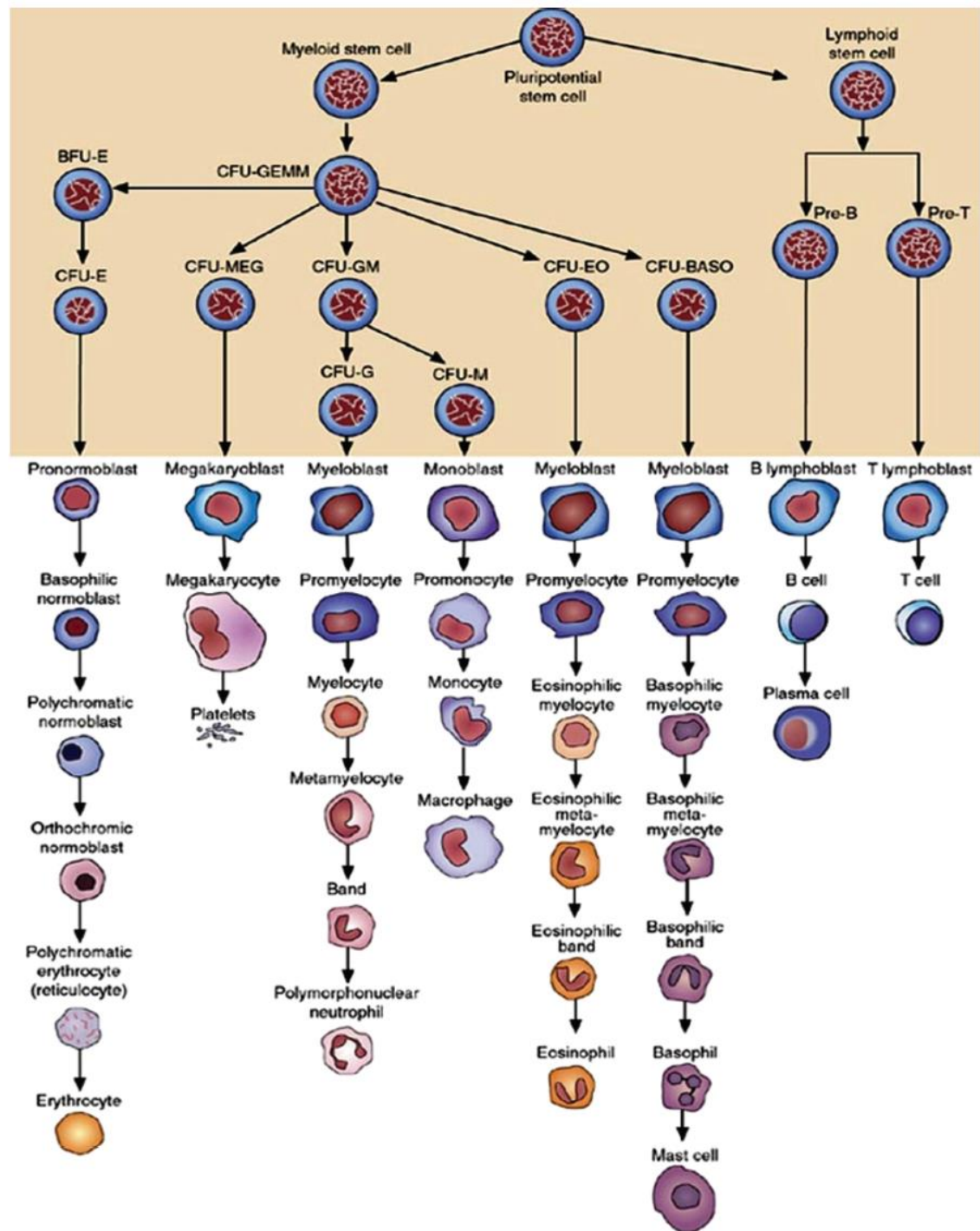


|             | CD34 | CD133 | CD135<br>(flt-3) | CD45 | CD90<br>Thy-1 | Lin<br>CD38,33 | Sca-1 | c-Kit | CD150 | CD48 | CD244 | Rh123<br>Hoechst | HLA-<br>DR      |
|-------------|------|-------|------------------|------|---------------|----------------|-------|-------|-------|------|-------|------------------|-----------------|
| Primary-HSC | -    | +     | -                | +    | +             | -              | +     | low   | +     | -    | -     | -                | -               |
| LTC-HSC     | +    | +     | -                | +    | +             | -              | +     | +     | +     | -    | -     | -                | -               |
| STC-HSC     | +    | +     | +                | +    | -             | -              | +     | +     | -     | -    | +     | low              | -               |
| HPP         | +    | low   | +                | +    | -             | +              | low   | +     | -     | +    | -     | +                | ± <sup>11</sup> |



شکل ۱۷-۱۷: مسیرهای مختلف تمایز هماتوپوئیتیک که با تبدیل STC-HSC به دو پروژنیاتور CMP و CLP همراه می‌باشد.





استمسل مادر ← LTC-HSC ← STC-HSC ← پروژنیاتور مشترک اولیه ← پروژنیاتور ردهای ← پرهگورسور ردهای ← سلول بالغ نهایی

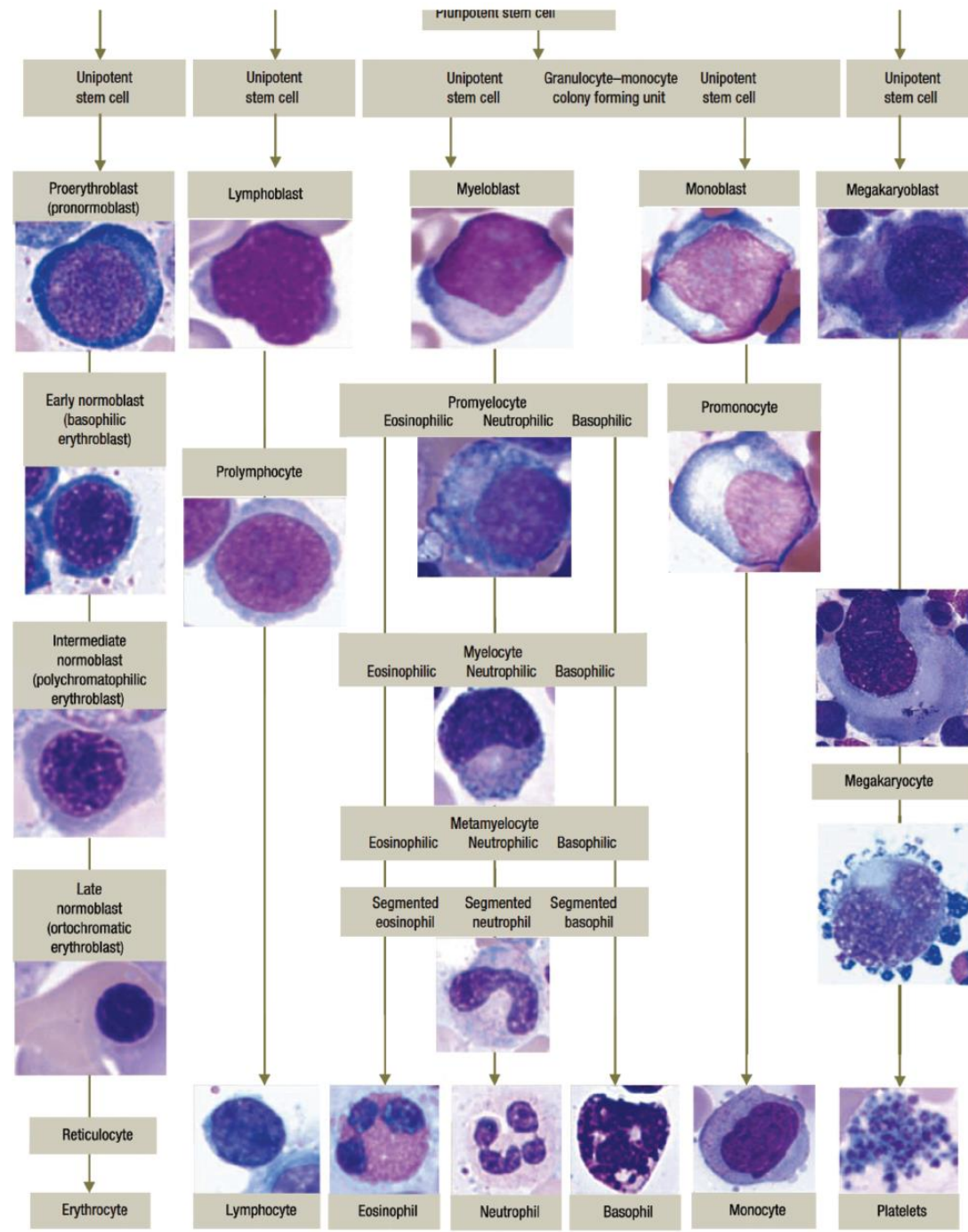
مثال این مسیر تمایزی برای رده اریترئیدی یا گرانولوسیتی به صورت زیر است که در آن استمسلها با رنگ بنفش، پروژنیاتورها با رنگ قرمز، پره-کورسورها با رنگ سیاه و سلول نهایی با رنگ آبی نشان داده شده است:

رده اریترئیدی:

Primary-HSC ← LTC-HSC ← STC-HSC ← CMP(CFU-GEMM) ← MEP(CFU-ME) ← BFU-E ← CFU-E ← پرونورموبلاست ← بازوفیلیک نورموبلاست ← پلی کروماتوفیلیک نورموبلاست ← اورتو کروماتوفیلیک نورموبلاست ← رتیگولوسیت ← RBC.

رده نوتروفیلی:

Primary-HSC ← LTC-HSC ← STC-HSC ← CMP(CFU-GEMM) ← GMP(CFU-GM) ← CFU-G ← میلوبلاست ← پرومیلویت ← میلویت ← متامیلوسیت ← باندسل ← نوتروفیل.



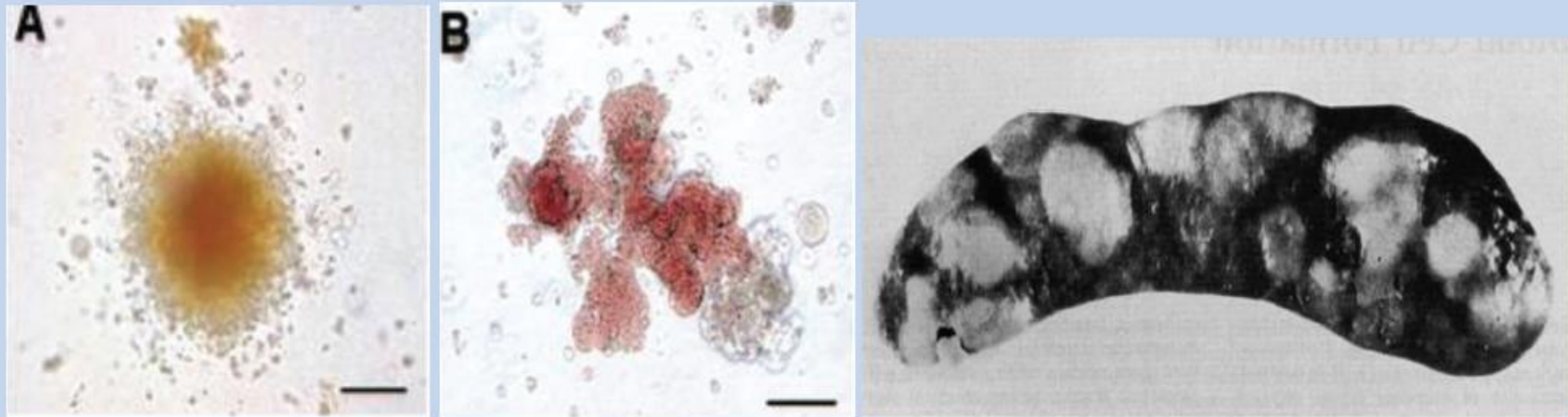
در مراجع مختلف:

به STC-IC، واحد تشکیل دهنده کلونی-طحال (CFU-S)<sup>۱</sup>،

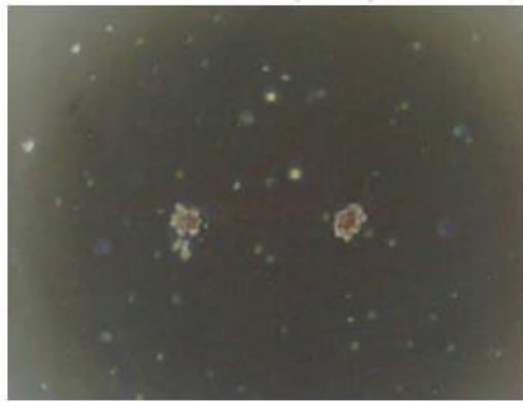
به CMP، واحد تشکیل دهنده کلونی-گرانولوسیت/اریتروسیت/مونوسیت/مگاکاریوسیت یا واحد تشکیل دهنده کلونی-مخلوط (CFU-GEMM or CFU-Mix)،

به MEP، واحد تشکیل دهنده کلونی-مگاکاریوسیت/اریتروسیت (CFU-MegE)

و به GMP، واحد تشکیل دهنده کلونی-گرانولوسیت/مونوسیت-ماکروفاژ (CFU-GM) گفته می‌شود که خیلی از این عبارات هنوز هم معتبر هستند.

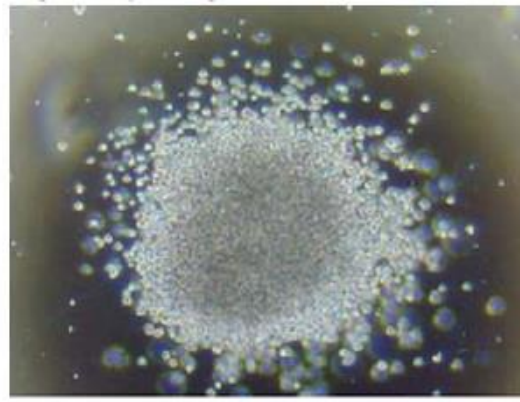


شکل ۱۸-۱۷: (A) تصویر CFU-GEMM و (B) تصویر BFU-E و (C) تصویری از CFU-S که ۷ روز بعد از تزریق HSC به ورید دم موش اشعه دیده، به صورت کلونی در سطح طحال موش تشکیل می‌شود. هر کلونی معادل ده‌ها سلول خونی است که از یک HSC مشتق می‌شوند. لذا تعداد کلونی‌ها با تعداد HSC‌های موجود در نمونه اولیه برابری می‌کند. علاوه بر سطح طحال، در قسمت‌های عمقی طحال نیز کلونی‌هایی وجود دارد که کلونی‌های سطحی بیانگر پروژنیاتورهای اریتروئیدی و کلونی‌های عمقی بیانگر پروژنیاتورهای مگاکاریوسیتی و میلوسیتی می‌باشند. HSC‌های تزریق شده علاوه بر طحال، در BM موش نیز مستقر می‌شوند ولی کلونی آنها قابل مشاهده نبوده و سلول‌های حاصل از آنها بلافاصله در BM پخش شده و وارد وریدهای خونی می‌شوند. موش‌های مورد استفاده در این تست از نوع NOD/SCID هستند که به‌طور ژنتیکی سیستم ایمنی آنها مختل بوده و لذا واکنش‌های رد پیوند نسبت به HSC‌های تزریقی را نشان نمی‌دهند.



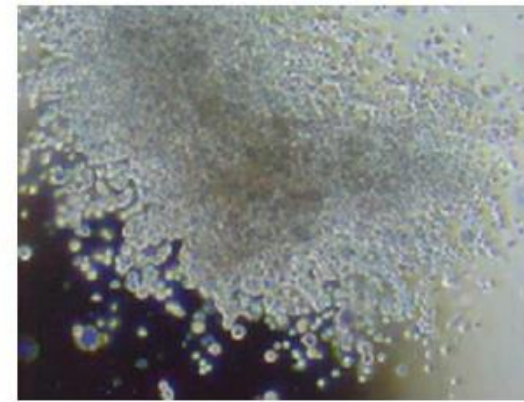
**CFU-E (Colony forming unit-erythroid):**

Clonogenic progenitors that produce only one or two clusters with each cluster containing from 8 to approximately 100 hemoglobinized erythroblasts. It represents the more mature erythroid progenitors that have less proliferative capacity.



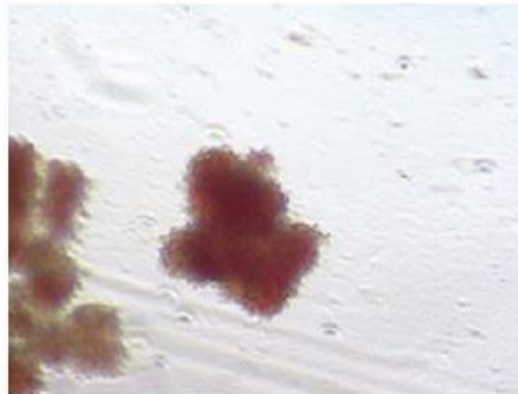
**CFU-G (Colony forming unit-granulocyte):**

Clonogenic progenitors of granulocytes that give rise to a homogeneous population of eosinophils, basophils or neutrophils.

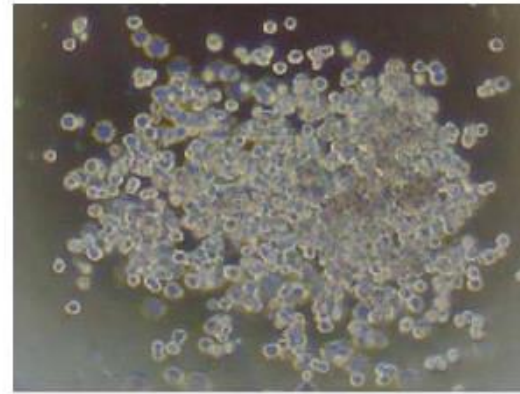


**CFU-GM (Colony forming unit-granulocyte, macrophage):**

Progenitors that give rise to colonies containing a heterogeneous population of macrophages and granulocytes. The morphology is similar to the CFU-M and CFU-G descriptions.

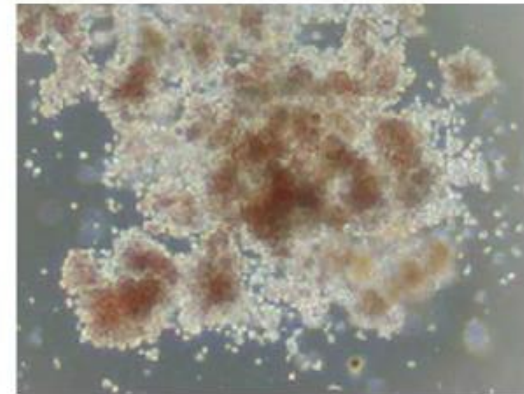


**BFU-E (Burst forming unit-erythroid):** The size of the colony can be described as small (3 to 8 clusters), intermediate (9 to 16 clusters), or large (more than 16 clusters) according to the number of clusters present. These are primitive erythroid progenitors that have high proliferative capacity.



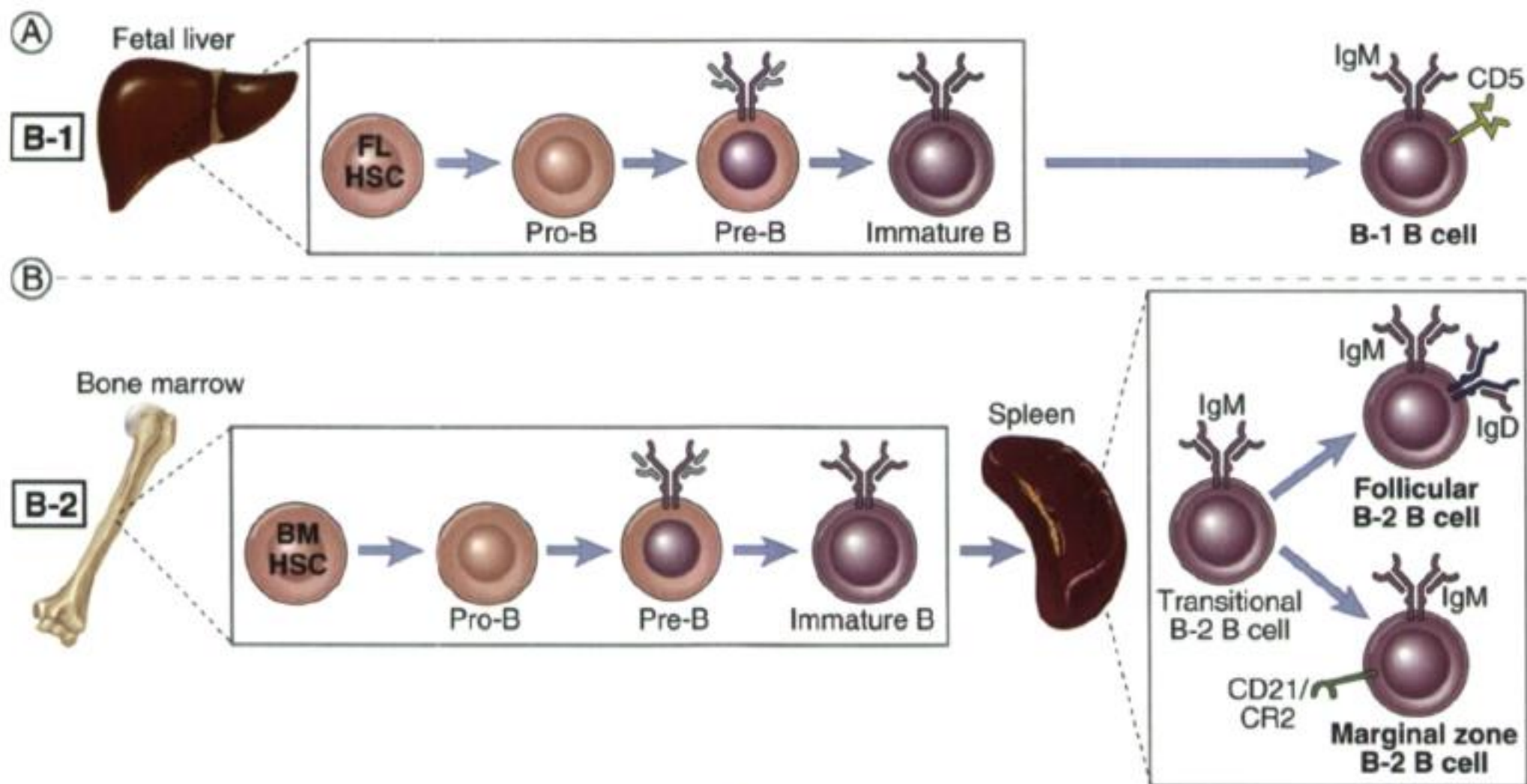
**CFU-M (Colony forming unit-macrophage):**

Clonogenic progenitors of macrophages that give rise to a homogenous population of macrophages.

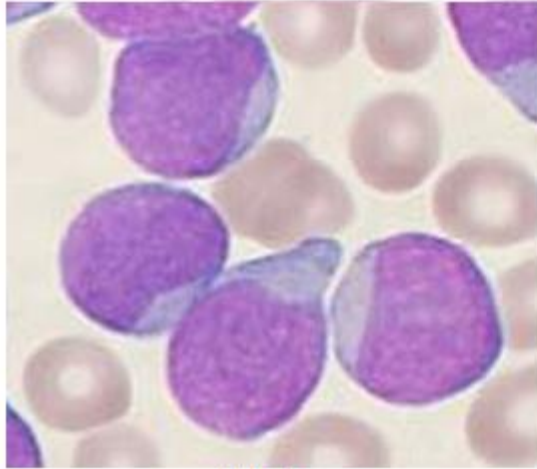


**CFU-GEMM (Colony forming unit-granulocyte, erythrocyte, macrophage, megakaryocyte):**

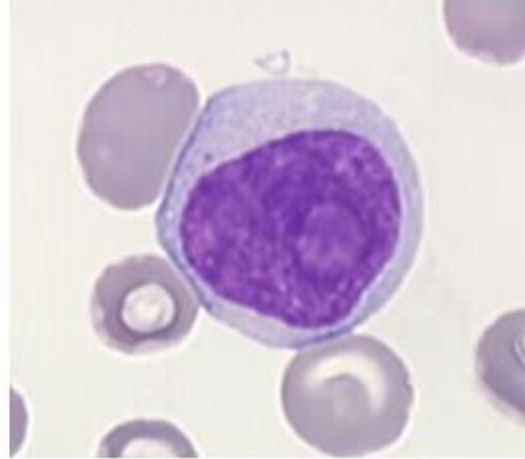
Multi-lineage progenitors that give rise to erythroid, granulocyte, macrophage and megakaryocyte lineages, as the name indicates.



شکل ۱۵-۱۷: مراحل تولید لنفوسیت‌های B نوع B-1 و B-2 که به ترتیب در کبد و BM صورت می‌گیرد [۳۶].

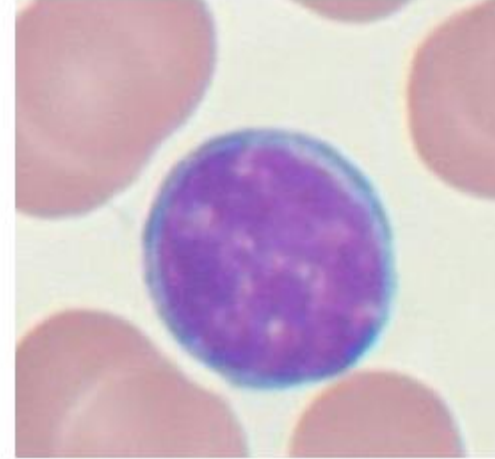


**ALL**



**PLL**

**>55% ProL**

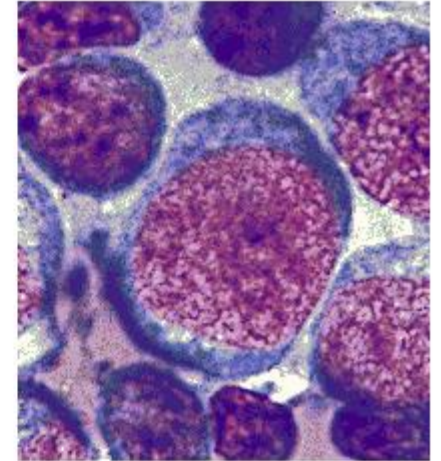


**CLL**

**<10% ProL**

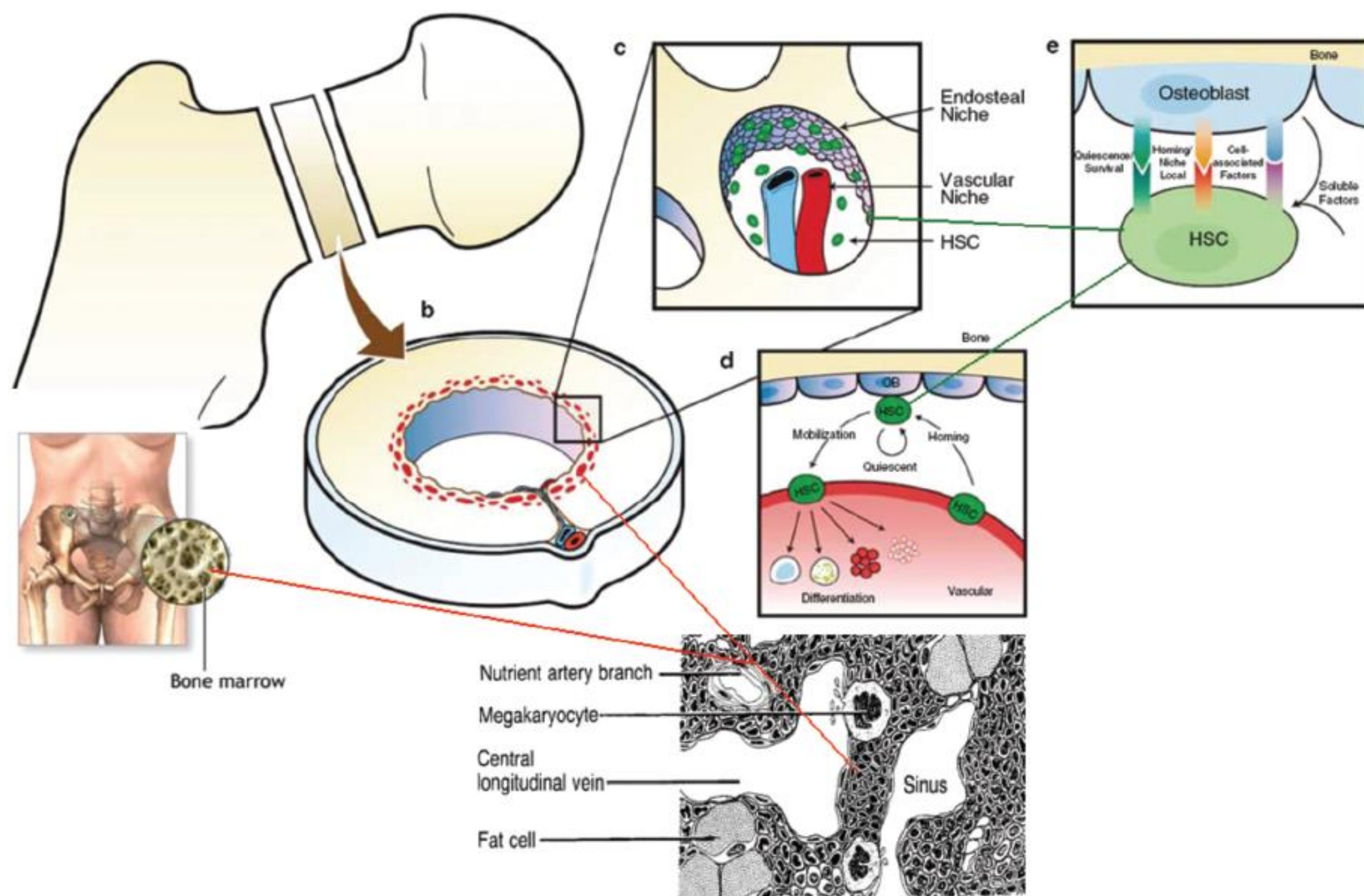
**CLL/PLL**

**10-55% ProL**

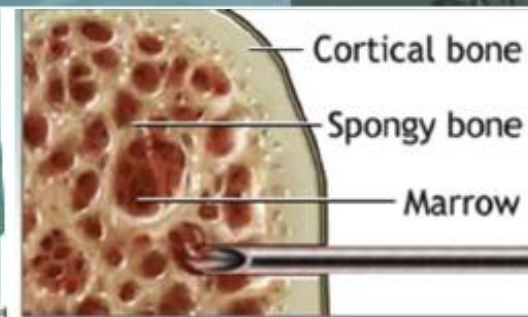
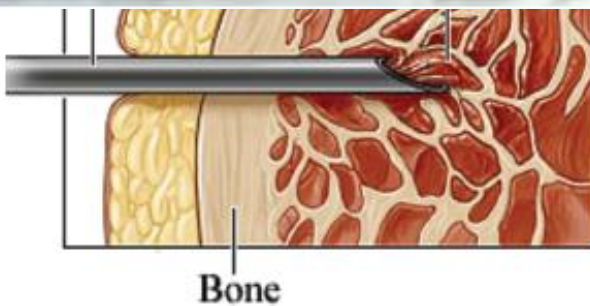
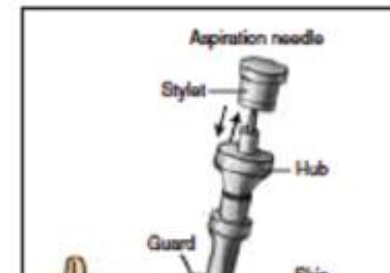
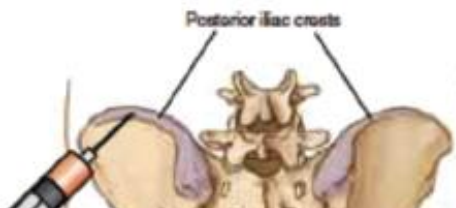


**Rischter/DLBCL**

# Bone Marrow Examination



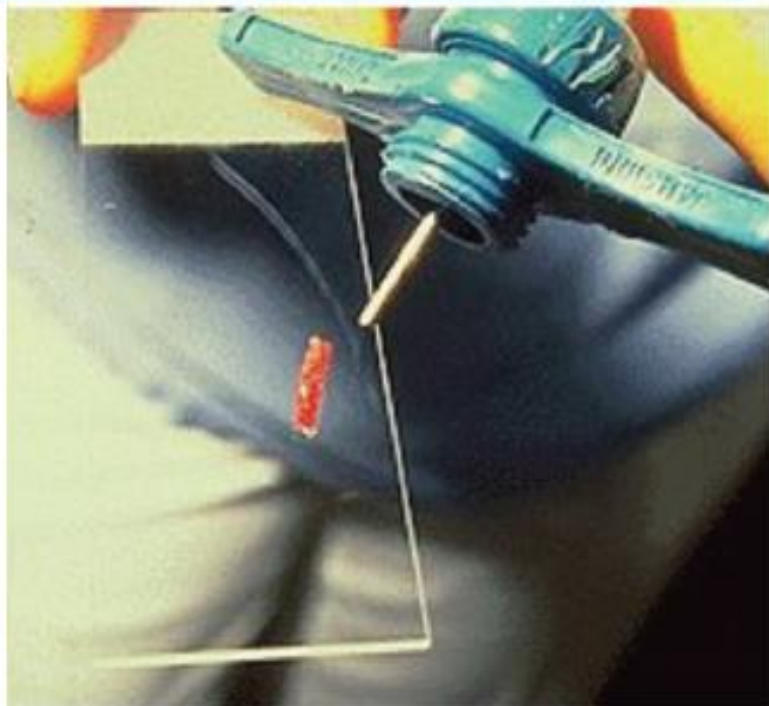
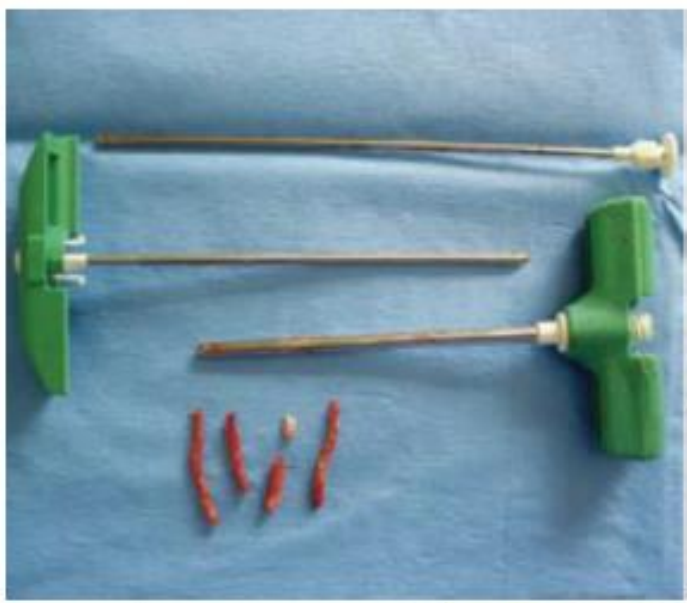
شکل ۱-۸: نمایی شماتیک از موقعیت و انواع سلول‌های تشکیل دهنده BM [۲۱].

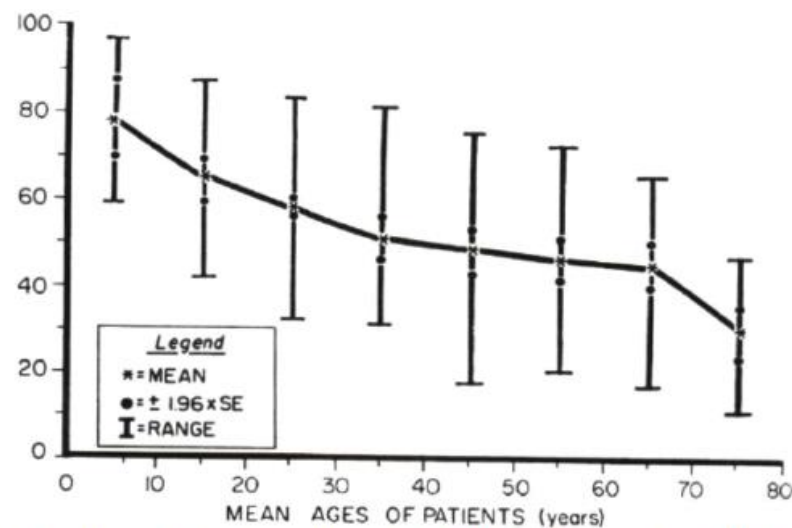




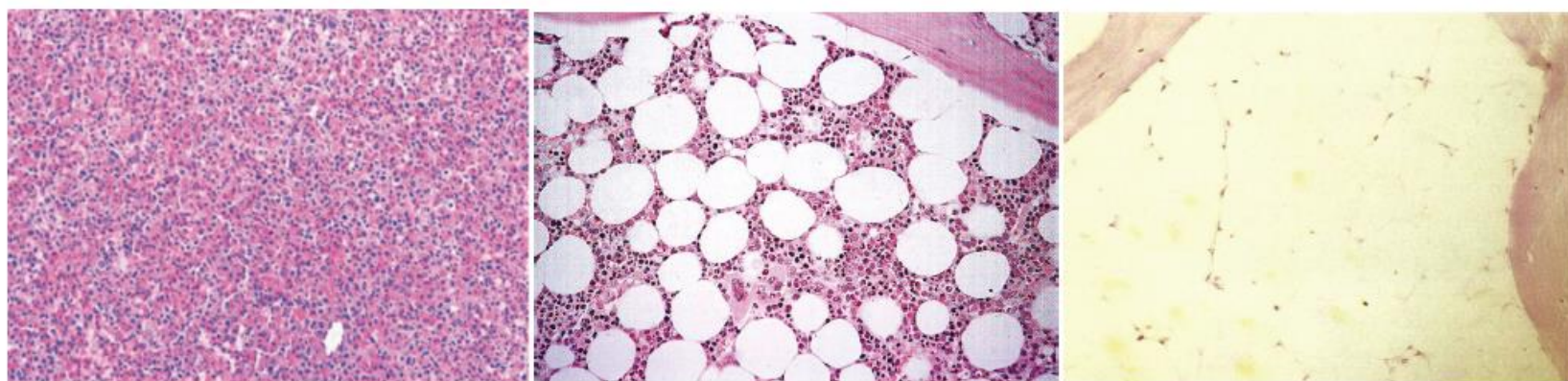
شکل ۱-۲۰: از راست به چپ: (۱) سوزن جدید ایلینویز، (۲) سوزن قدیم ایلینویز، (۳) سوزن ژور-وت، (۴) سوزن قدیم جمشیدی و (۵) سوزن جدید جمشیدی





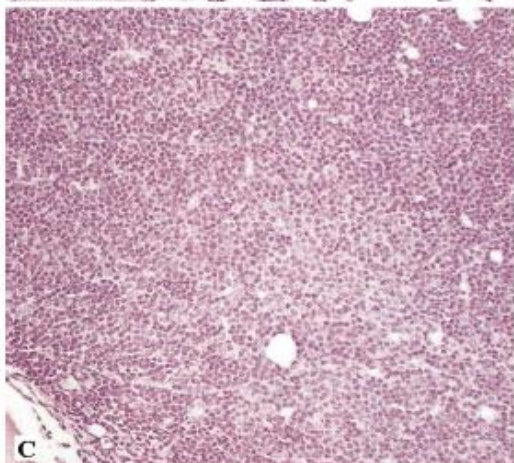
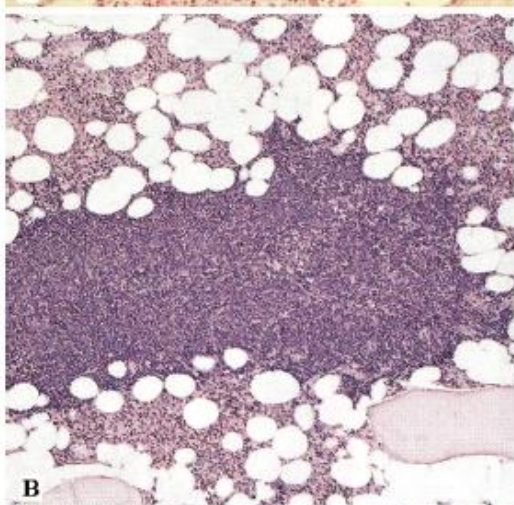
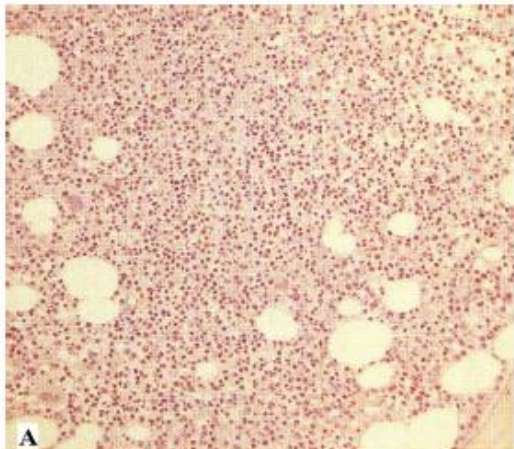


شکل ۱۸-۲۰: کاهش وابسته به سن سلولاریته PIC طبیعی از ۱۰۰٪ در بدو تولد تا ۳۰٪ در بالای ۷۰ سالگی [۸].

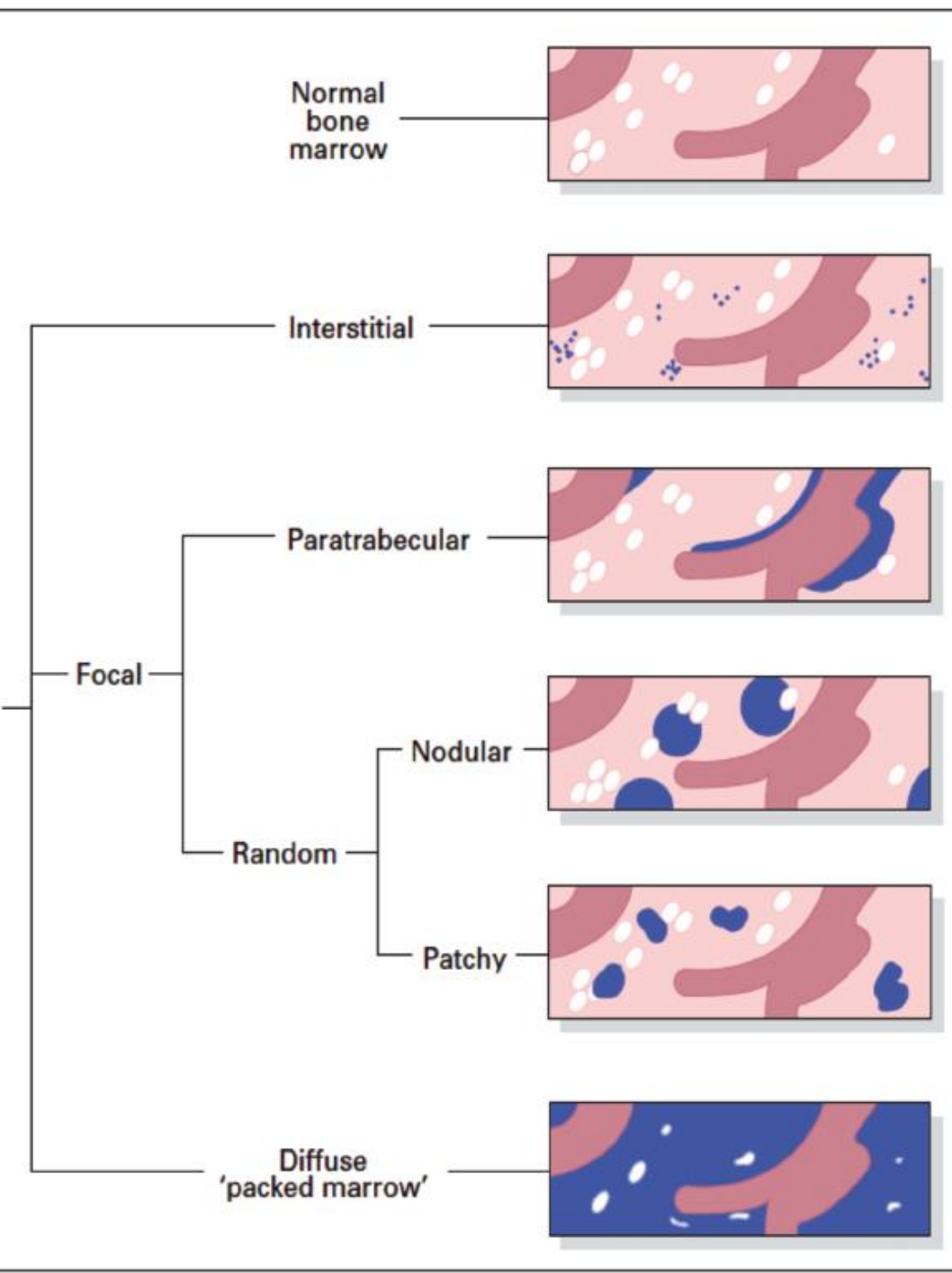


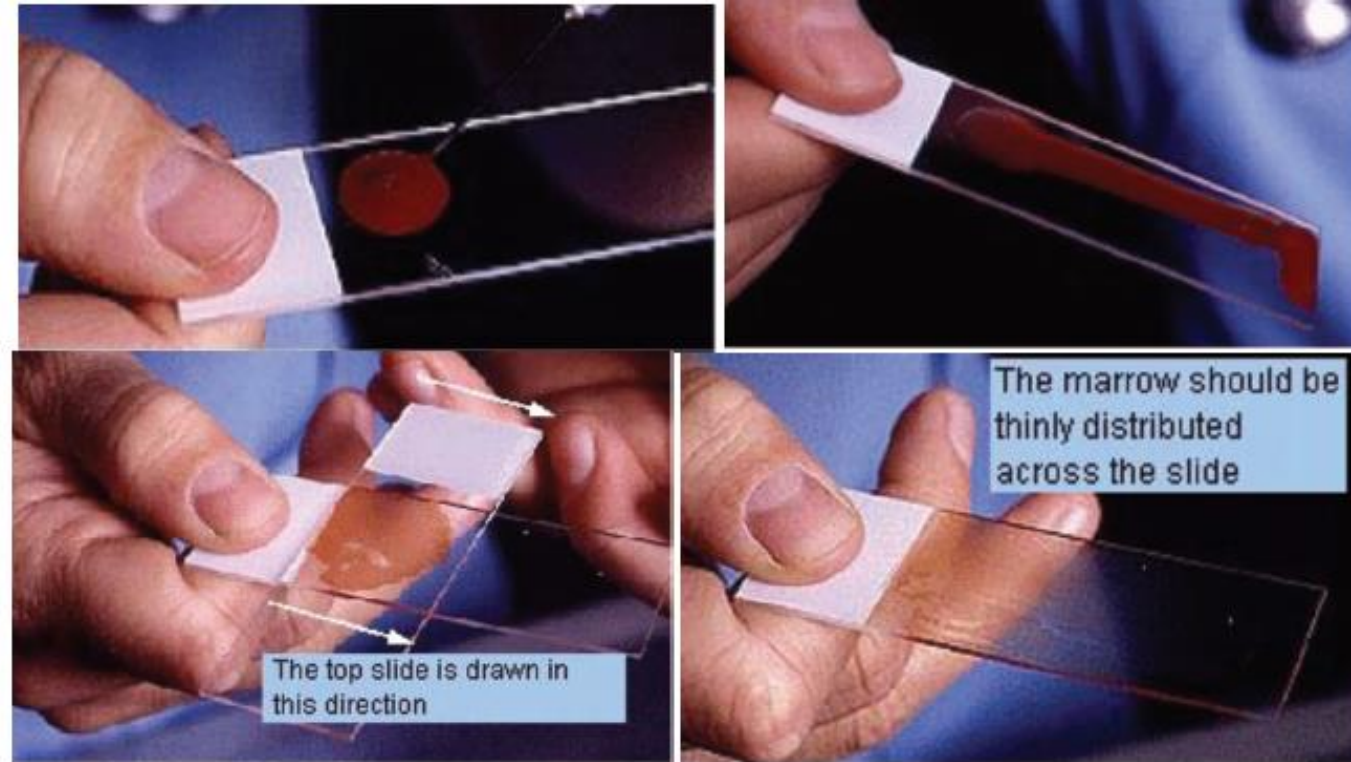
شکل ۱۹-۲۰: تصویر راست: شرایط هیپوسلولار شدید (۵٪ سلول‌های خون‌ساز ۹۵٪ آدیپوسیت)، تصویر وسط: شرایط نورموسلولار (۵۰٪ سلول‌های خون‌ساز به ۵۰٪ آدیپوسیت)، تصویر چپ: شرایط هیپرسلولار (۹۵٪ سلول‌های خون‌ساز به ۵٪ آدیپوسیت) [۸].

یا خردسالی اشاره نمود. میزان سلولاریته هر فردی با توجه به سن شخص و نوع استخوان مورد نمونه‌برداری فرق می‌کند. برای مثال، در سن ۵۰ سالگی متوسط سلولاریته در استخوان مهره ۷۵٪، جناغ ۶۰٪، ستیغ ایلیاک ۵۰٪ و در دنده‌ها ۳۰٪ است. از طرفی دیگر، سلولاریته طبیعی استخوان PIC ایلیاک نیز در سنین مختلف فرق داشته و از بدو تولد تا ۳ ماهگی، حدود ۱۰۰٪، از ۳ ماهگی تا ۱۸ ماهگی حدود ۸۵٪، از ۱۸ ماهگی تا ۱۰ سالگی حدود ۸۵٪ تا ۲۰ سالگی ۶۵٪، تا ۳۰ سالگی ۵۰٪، تا ۴۰ سالگی ۴۵٪، تا ۵۰ سالگی ۴۰٪، تا ۶۰ سالگی ۳۵٪ و در ۷۰ سالگی یا بالاتر به ۳۰٪ کاهش پیدا می‌کند. همان‌طوری که اشاره شد، بجز مقاطع بافتی بیوپسی، مقایسه ناحیه دنباله مانند گستره‌های آسپیراسیون توسط یک فرد مجرب نیز قادر است یک برآورد نسبتاً دقیق و معقولانه از سلولاریته BM را فراهم کند.

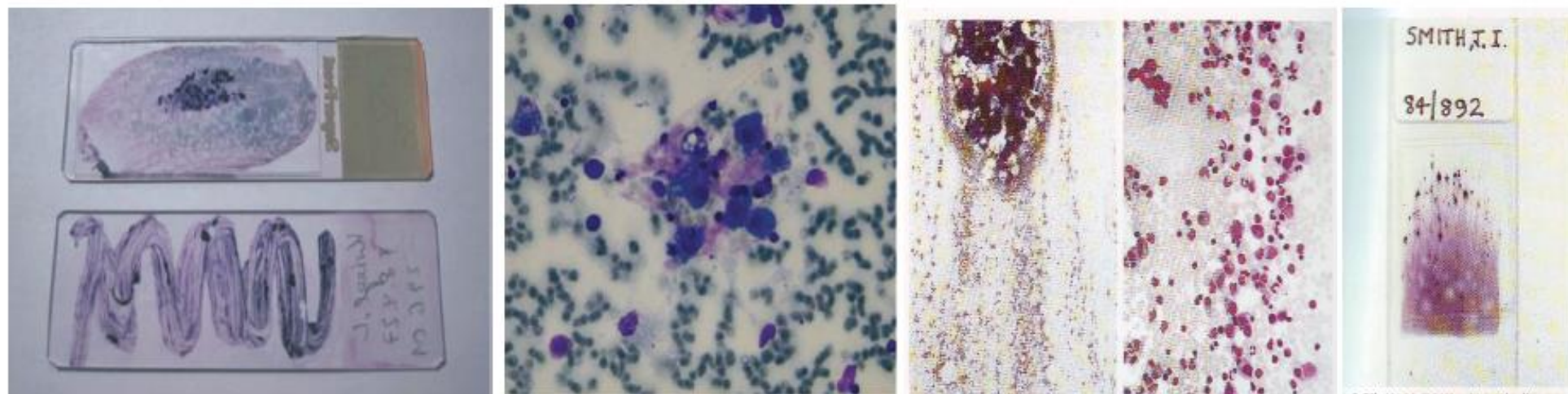


**Patterns of bone marrow infiltration**





شکل ۱۰-۲۰: روش تهیه گستره له شده یا اسکواش از پارتیکل‌های آسپیره BM

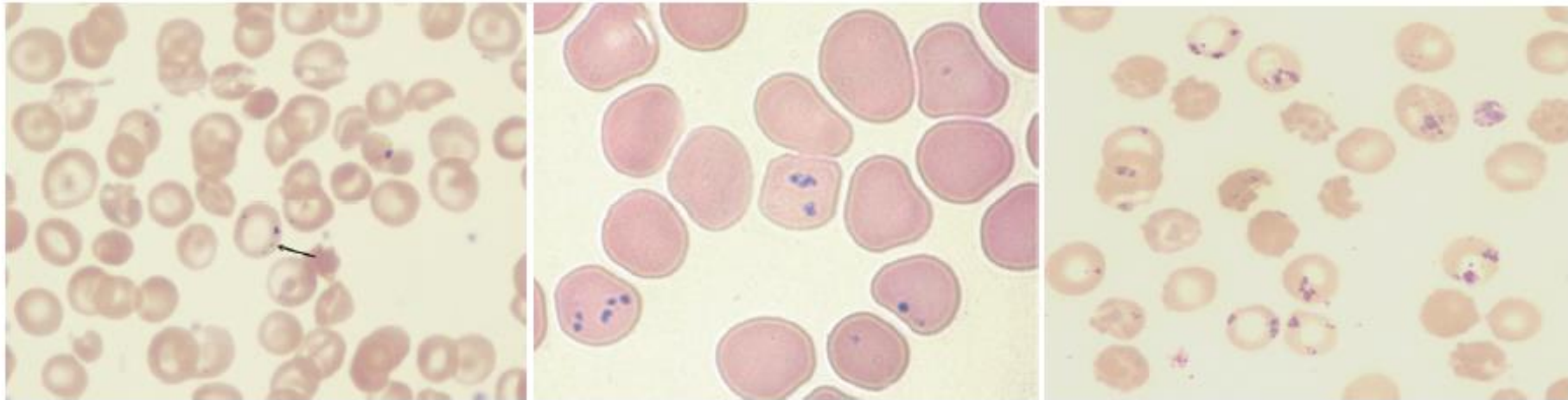
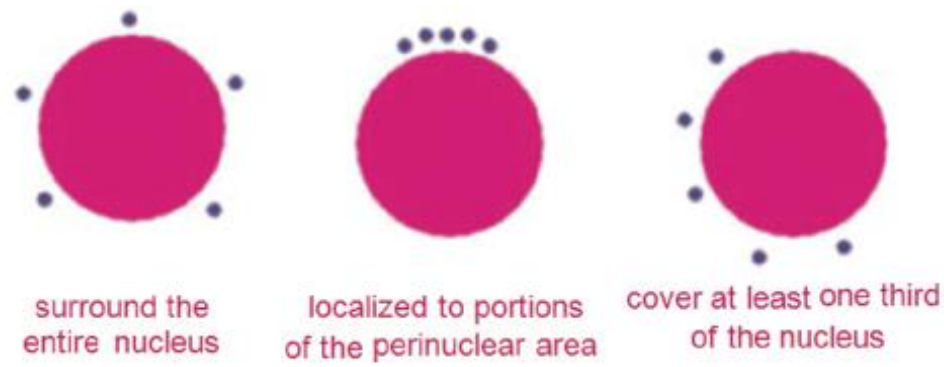


شکل ۱۱-۲۰: گستره مستقیم از آسپیراسیون BM و پارتیکل‌های خاکستری سطح آن که در بزرگنمایی بیشتر توده‌ای از سلول‌های پیش‌ساز خونی را نشان می‌دهد.

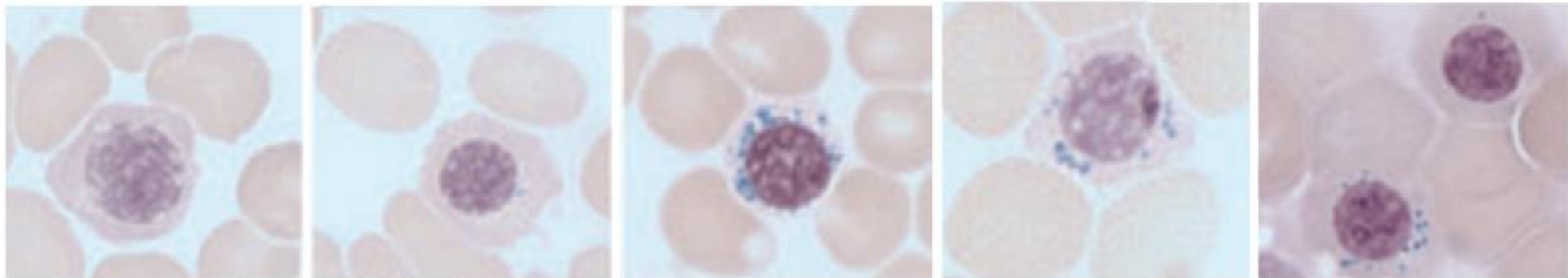
| Cell types            | ROSSE (1977) (mean, SD) |              |              | MAUER (1969)     | JANDL (1987)     |
|-----------------------|-------------------------|--------------|--------------|------------------|------------------|
|                       | Birth                   | 1 month      | 18 months    | Childhood        | Adult            |
| Normoblasts, total    | 14.48 ± 7.24            | 8.04 ± 5.00  | 8.21 ± 3.71  | 23.1             | 21.5 (14.2–30.4) |
| Pronormoblasts        | 0.02 ± 0.06             | 0.10 ± 0.14  | 0.08 ± 0.13  | 0.5 (0.0–1.5)    | 0.6 (0.2–1.4)    |
| Basophilic n.         | 0.24 ± 0.25             | 0.34 ± 0.33  | 0.50 ± 0.34  | 1.7 (0.2–4.8)    | 2.0 (0.7–3.7)    |
| polychromatophilic n. | 13.06 ± 6.78            | 6.90 ± 4.45  | 6.97 ± 3.56  | 18.2 (4.8–34.0)  | 12.4 (12.2–24.2) |
| Orthochromatic n.     | 0.69 ± 0.73             | 0.54 ± 1.88  | 0.44 ± 0.49  | 2.7 (0.0–7.8)    | 6.5 (2.0–22.7)   |
| Neutrophils, total    | 60.37 ± 8.66            | 32.35 ± 7.68 | 36.06 ± 7.40 | 57.1             | 56.0 (45.1–66.5) |
| Myeloblasts           | 0.31 ± 0.31             | 0.62 ± 0.50  | 0.06 ± 0.08  | 1.2 (0.0–3.2)    | 1.0 (0.5–1.8)    |
| Promyelocytes         | 0.79 ± 0.91             | 0.76 ± 0.65  | 0.64 ± 0.59  | 1.4 (0.0–4.0)    | 3.4 (2.6–4.6)    |
| Myelocytes            | 3.95 ± 2.93             | 2.50 ± 1.48  | 2.49 ± 1.39  | 18.3 (8.5–29.7)  | 11.9 (8.1–16.9)  |
| Metamyelocytes        | 19.37 ± 4.84            | 11.30 ± 3.59 | 12.42 ± 4.15 | 23.3 (14.0–34.2) | 18.0 (9.8–25.3)  |
| Bands                 | 28.89 ± 7.56            | 14.10 ± 4.63 | 14.20 ± 5.23 |                  | 11.0 (8.5–20.8)  |
| Segmented             | 7.37 ± 4.64             | 3.64 ± 2.97  | 6.31 ± 3.91  | 12.9 (4.5–29.0)  | 10.7 (8.0–16.0)  |
| Eosinophils           | 2.70 ± 1.27             | 2.61 ± 1.40  | 2.70 ± 2.16  | 3.6 (1.0–9.0)    | 3.2 (1.2–6.2)    |
| Basophils             | 0.12 ± 0.20             | 0.07 ± 0.16  | 0.10 ± 0.12  | 0.06 (0.0–0.8)   | <0.1 (0.0–0.2)   |
| Lymphocytes, total    | 15.6                    | 49.0         | 45.5         | 16.0 (4.8–35.8)  | 15.8 (10.8–22.7) |
| Transitional          | 1.18 ± 1.13             | 1.95 ± 0.94  | 1.99 ± 1.00  |                  |                  |
| Small                 | 14.42 ± 5.54            | 47.05 ± 9.24 | 43.55 ± 8.56 |                  |                  |
| Plasma cells          | 0.00 ± 0.02             | 0.02 ± 0.06  | 0.06 ± 0.08  | 0.4 (0.2–0.6)    | 1.8 (0.2–2.2)    |
| Monocytes             | 0.88 ± 0.85             | 1.01 ± 0.89  | 2.12 ± 1.59  |                  | 1.8 (0.2–2.8)    |
| Megakaryocytes        | 0.06 ± 0.15             | 0.05 ± 0.09  | 0.07 ± 0.12  |                  | <1.0 (0.0–0.2)   |
| Reticulum cells       |                         |              |              |                  | 0.3 (0.0–0.5)    |
| M/E ratio             | 4.2                     | 4.0          | 4.4          | 2.9 (1.2–5.2)    | 2.5 (1.2–5.0)    |

نتایج شمارش سلولی در مورد نمونه آسپیراسیون یک بیمار به صورت میلوبلاست ۶۵٪، متامیلوسیت ۴٪، باند ۱٪ نوتروفیل ۸٪، پرونورموبلاست ۲٪، بازوفیلیک نورموبلاست ۳٪، پلی کروماتوفیلیک نورموبلاست ۳٪، اورتوکروماتوفیلیک نورموبلاست ۳٪، لنفوسیت ۴٪ و مونوسیت ۳٪ است. نسبت M:E در این بیمار چگونه است؟

همان‌طوری که اشاره شد، در محاسبه M:E درصد لنفوسیت، پلاسماسل، مونوسیت و مگاکاریوسیت شمارش نمی‌شوند، لذا سلول‌های میلوئید برابر ۷۸٪ (۸+۱+۴+۶۵) و سلول‌های اریتروئید برابر ۱۱٪ (۳+۳+۳+۲) خواهند بود و بدین ترتیب M:E برابر ۷.۴:۱ می‌شود.



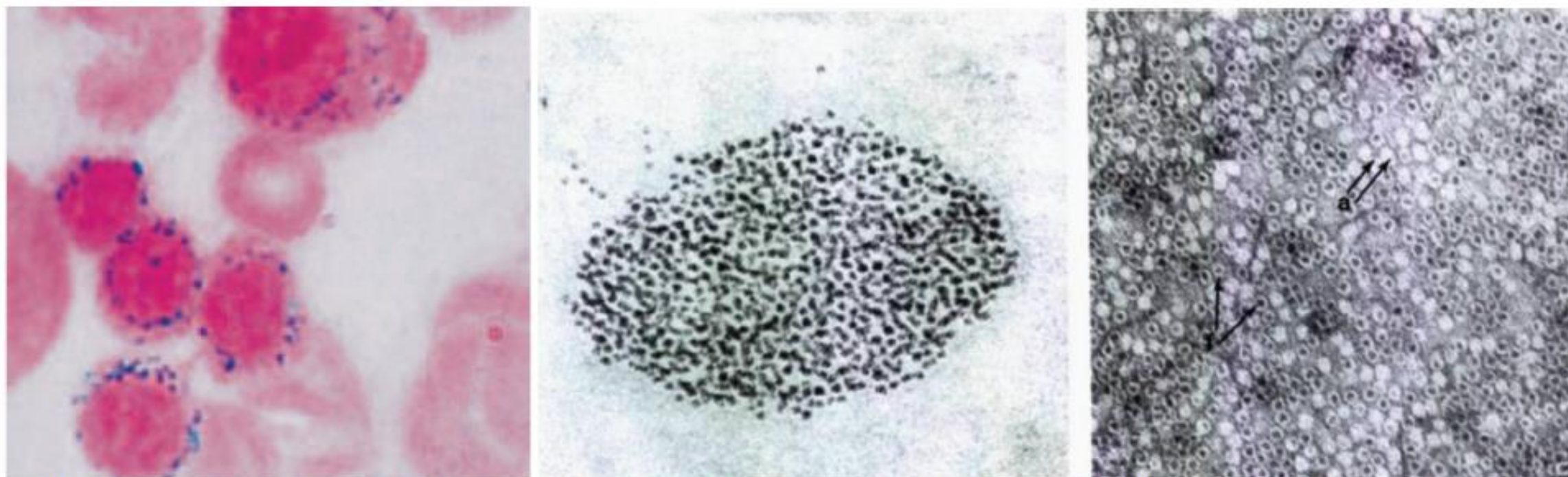
شکل ۳۴-۲۰: سیدروسیت‌های حاوی سیدروزوم چندتایی



No siderotic granules type 1 sideroblast (1 granule)

type 3 sideroblast (numerous granules)

شکل ۳۵-۲۰: انواع مختلف سیدروبلاست‌های حلقوی

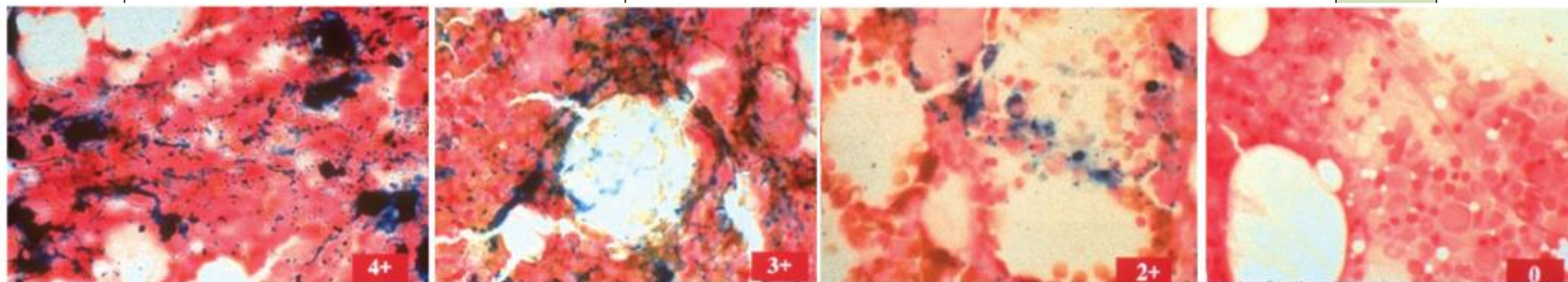


شکل ۳۲-۲۰: تصویر راست): میکروگراف الکترونی از فریتین و آپوفریتین‌هایی که به صورت نگاتیوی رنگ شده‌اند. پروتئین‌های آپوفریتین (a) پروتئین‌های خالی از آهن هستند که وسط آنها هنوز از آهن (رنگ سیاه) پر نشده است ولی با قرار گیری آهن در آن و تشکیل فریتین (f)، ساختارهای تیره رنگی در آنها ایجاد می‌شود. تصویر وسط): میکروگراف الکترونی از یک سیدروزوم متصل به غشاء اریتروبلاست که نشان می‌دهد سیدروزوم از تعداد زیادی فریتین منفرد تشکیل شده است. تصویر چپ): تصویر میکروسکوپ نوری از سیدروزوم‌های آهن‌دار در داخل نورموبلاست‌های اریتروئیدی که با آبی پروس رنگ آمیزی شده است.

همان‌طوری که اشاره شد، بررسی ذخایر آهن BM از طریق ارزیابی میزان گرانول‌های آهن داخل ماکروفاژها و نورموبلاست‌های BM صورت می‌گیرد و گزارش آن نیز به صورت 0→Trace→1+→2+→3+→4+ یا Absent→Greatly Reduced→Present→Increased می‌باشد. ندرتاً تعداد محدودی گرانول آزاد نیز در فضای بین سلولی مشاهده می‌شود. البته بر اساس رتبه‌بندی گال، ۷ درجه برای فقر آهن در نظر گرفته شده است که در جدول ۹-۲۰ نشان داده شده است.

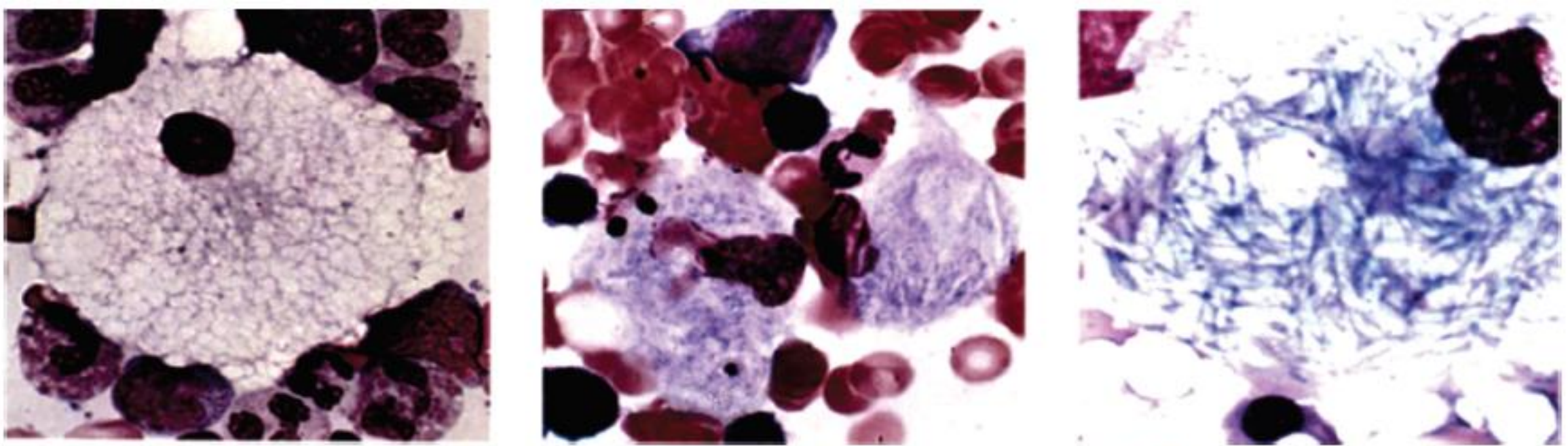
جدول ۸-۲۰: رتبه‌بندی ذخایر آهن BM بر اساس معیارهای پاتولوژی

| درجه | مقدار کمی هموسیدرین‌ها                                      | اندازه عمده گرانول‌های هموسیدرینی |
|------|-------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| 0    | در هیچ میدانی از گسترش با بزرگنمایی ۱۰۰×، آهن دیده نمی‌شود. | -                                 |

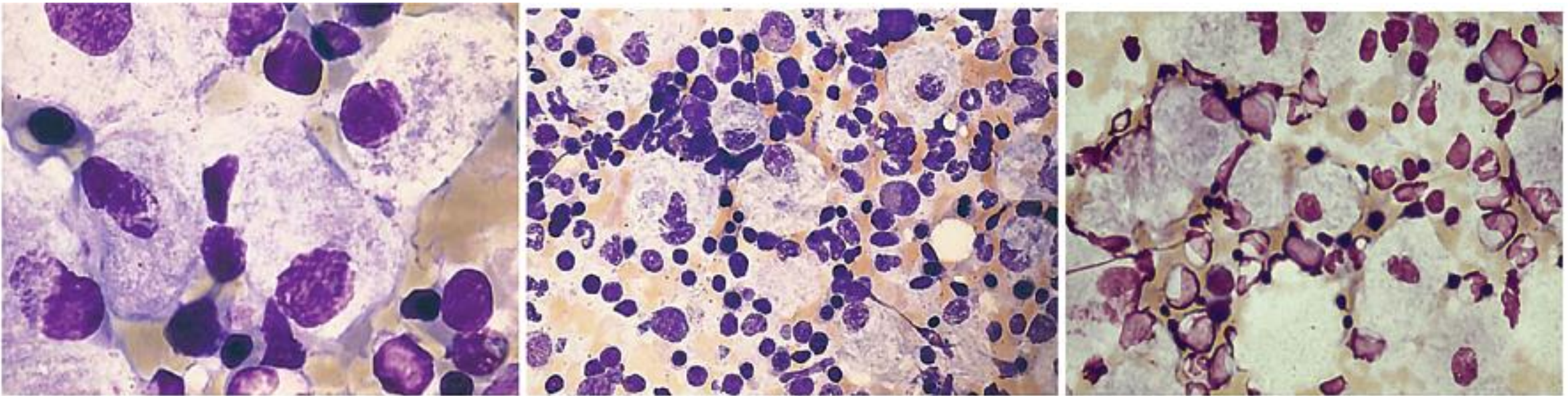


شکل ۳۷-۲۰: مراحل چهارگانه ذخایر آهن BM به روش رنگ آمیزی آبی پروس (پرل)

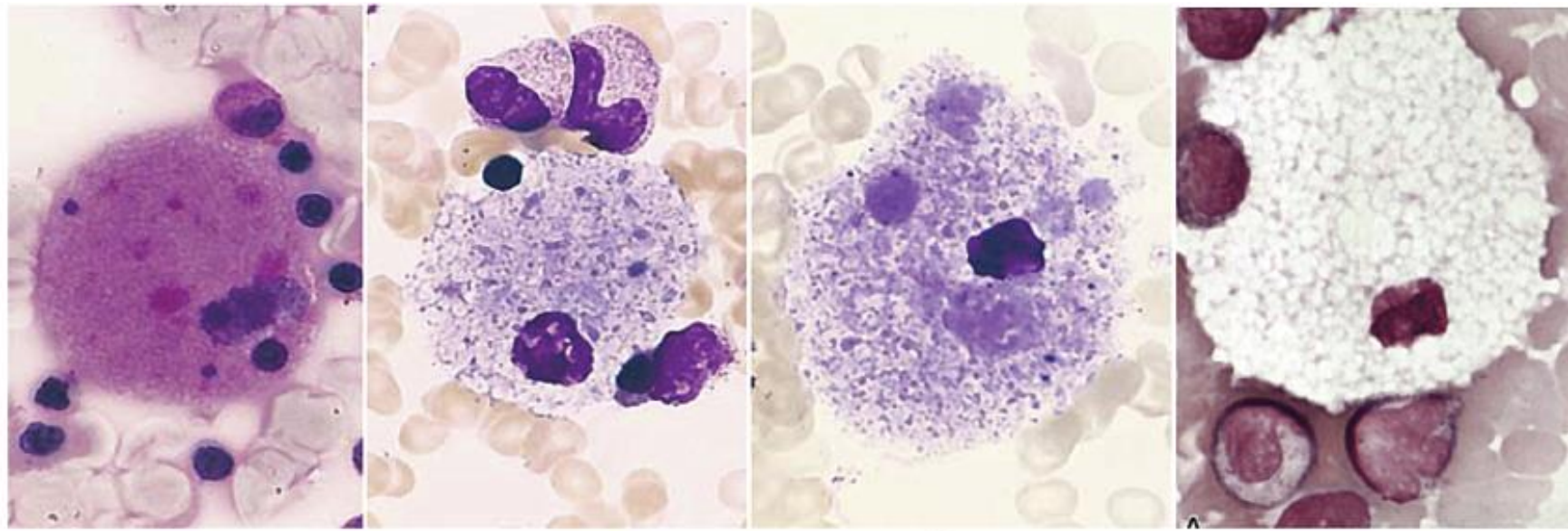
|         |                |                                                                                                                         |
|---------|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Grade 0 | none           | no visible iron under high power magnification ( $\times 1000$ )                                                        |
| Grade 1 | Very slight    | Small iron particles just visible in few reticulum cells under high power magnification ( $\times 1000$ )               |
| Grade 2 | Slight         | Small, sparsely distributed iron particles just visible under low power magnification ( $\times 100$ )                  |
| Grade 3 | Moderate       | Numerous small iron particles present in reticulum cells throughout the marrow fragment ( $\times 100$ )                |
| Grade 4 | Moderate heavy | Larger iron particles throughout the fragment with tendency to aggregate into clumps ( $\times 100$ )                   |
| Grade 5 | Heavy          | Dense, large clumps of iron throughout the fragment ( $\times 100$ )                                                    |
| Grade 6 | Very heavy     | Very large deposits of iron, both intra- and extra-cellular, obscuring cellular detail in the fragment ( $\times 100$ ) |



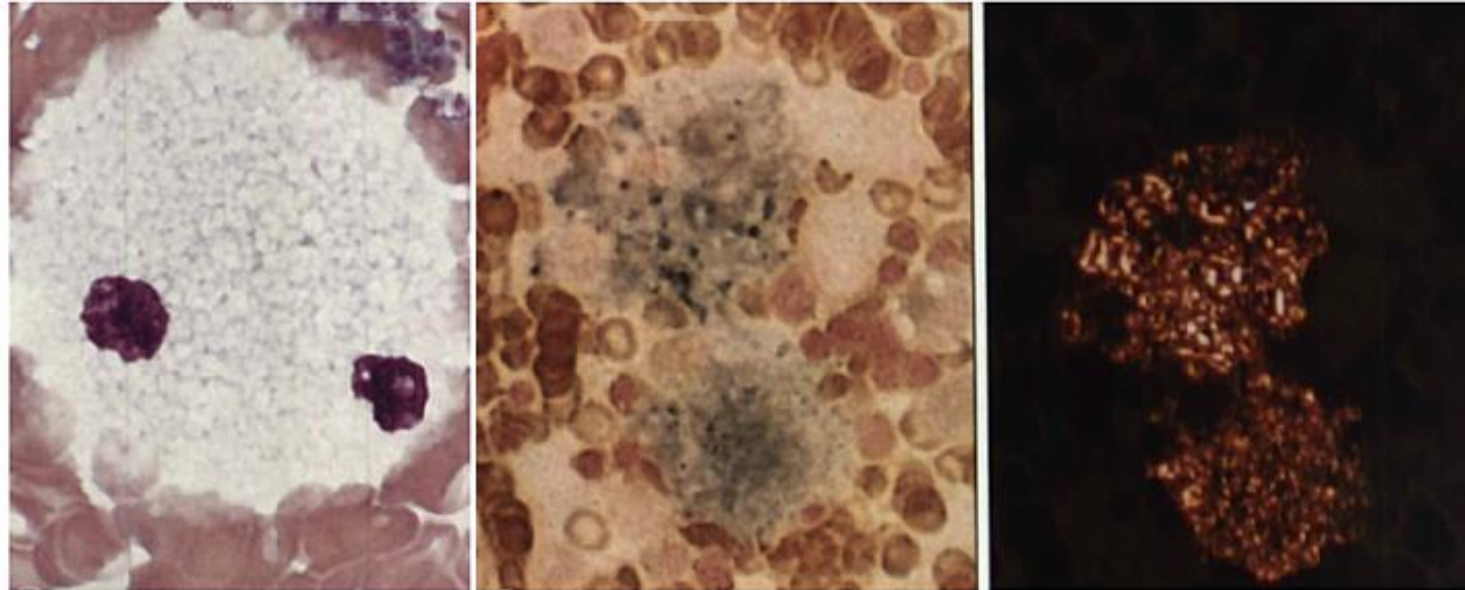
شکل ۲۷-۲۰: تصویر راست: سلول سودوگوشه، تصویر وسط: سلول گوشه و تصویر چپ: سلول نیم پیک



شکل ۱۵-۲۵: سلول های بزرگ و کف آلود گوشه با هسته کوچک، سیتوپلاسم فراوان و شبیه کاغذ مچاله



شکل ۲۳-۲۵: سلول‌های کف آلود، گرد با دیواره نسبتاً صاف نیم-پیک که نسبت به رنگ PAS واکنش مثبت ضعیفی را نشان می‌دهند [۲۵].



شکل ۲۴-۲۵: سلول‌های کف آلود نیم-پیک که نسبت به رنگ SBB (سودان سیاه B) واکنش مثبت ضعیفی را نشان می‌دهند (تصویر وسط). این سلول‌ها در زیر نور پلاریزه یک انکسار مضاعف قرمز رنگی را نشان می‌دهند (تصویر راست).

**تیپ A:** بیماران مبتلا به تیپ A، بیماری نورودژنراتیو با درگیری در سنین پایین را بروز می‌دهند که باعث مرگ بیمار در همان اوایل کودکی (۱-۲ سالگی) می‌شود. در این بیماران هپاتواسپلنومگالی، لنفادنوپاتی، سیر پیشرونده علائم نورولوژیکی، حملات صرع، اختلال بلع و لکه‌های قرمز توت‌فرنگی یا گیلانی (در ۵۰٪ موارد) نیز مشاهده می‌شود. با گذر زمان آتروفی بینایی نیز در این دسته از بیماران ایجاد می‌شود.

**تیپ B:** مبتلایان به نوع B، اختلالات ریوی و هپاتواسپلنومگالی با درگیری در سنین بالاتر (۱۱-۳ سالگی) داشته ولی درگیری عصبی ندارند. در این تیپ از بیماری به‌جای لکه قرمز گیلانی (CRS)، یک حلقه ماکولار بزرگ به اندازه نصف قطر شبکه دیده می‌شود که هاله اطراف آن کمرنگ و ناحیه وسط و کریستالوئید آن تیره رنگ دیده می‌شود. به این حلقه، **MHS**<sup>۲</sup> گفته می‌شود که ظاهراً ساختار حدواسط CRS می‌باشد.

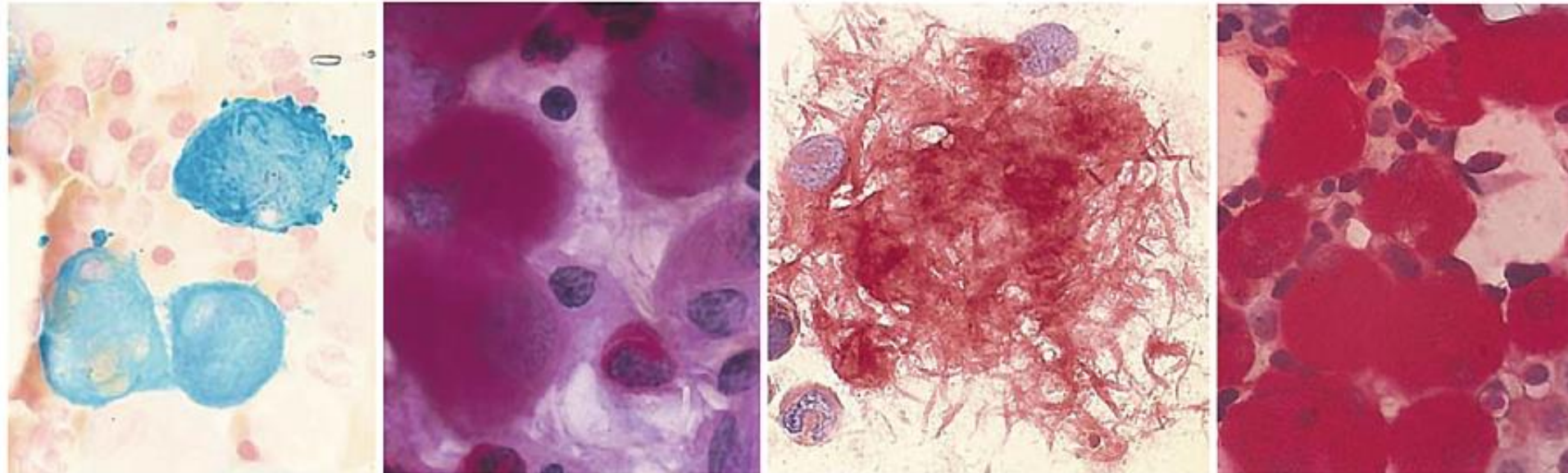
**تیپ C:** زیرگروه C اختلالات عصبی و عقب‌ماندگی‌های حرکتی سایکوموتور به همراه سیر پیشرونده آرام را نشان می‌دهد، بیماران اغلب تا سن ۲-۱ سالگی نرمال بوده (به‌جز هپاتیت و یرقان نوزادی) ولی بیماری به آرامی گسترش یافته و ناهنجاری‌های نورودژنراتیو متغیری را تظاهر می‌کند. در این بیماران یرقان نوزادی بدو تولد تا مدت زمان بیشتری تداوم داشته و بعدها تا سن بلوغ، هپاتواسپلنومگالی خفیفی نیز ایجاد می‌شود. در این بیماری به دلیل نقص در ترافیک داخل سلولی کلسترول، شاهد افزایش تجمعات کلسترول غیراستریفیه (نه اسفنگومیلین) می‌باشیم. در این فرم، هیستوسیت‌های آبی دریا نیز شایع می‌باشد. برای شناسایی بهتر بیماری رنگ‌آمیزی اختصاصی فیلیپین استفاده می‌شود که در آن به دلیل تجمعات LDL در اطراف هسته، سلول‌ها یک رنگ فلورسانت نشان می‌دهند. سرم بیماران نیز کلسترول بالایی داشته و در شبکه بیماران CRS و MHS مشاهده نمی‌شود. در بیماران جوان و بالغ، خیره شدن به جهت عمودی، به‌ویژه به سمت پایین دارای اختلال می‌باشد.

**تیپ D یا تیپ Nova Scotia:** در زیرگروه D، علائم در سنین کودکی شروع شده و پیشرفت دژنراسیون عصبی حتی از تیپ C نیز آهسته‌تر می‌باشد. این بیماری آللیک تیپ C بوده و در آن نیز اختلال در ترافیک کلسترول مشاهده می‌شود. این بیماران مشکل بینایی ندارند.

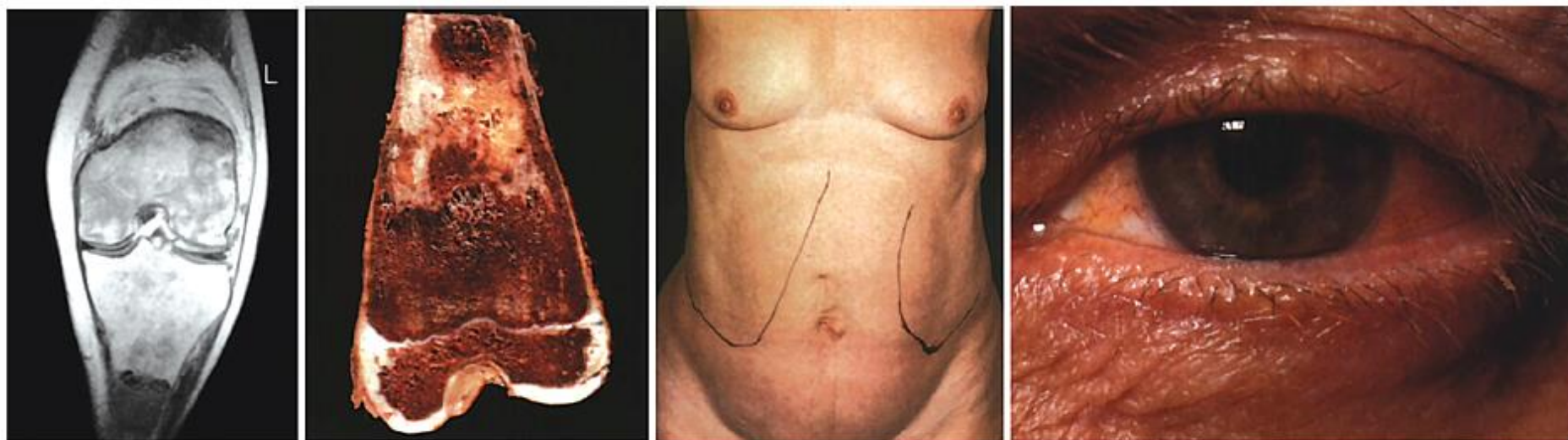
**تیپ E:** در زیرگروه E علائم در سنین بلوغ ایجاد شده و بیماری با درجات خفیفی از تجمعات اسفنگومیلین احشایی، اسپلنومگالی خفیف، حضور سلول‌های پف‌آلود احشایی و بدون عوارض عصبی تظاهر می‌یابد. در این بیماران لکه قرمز CRS نیز مشاهده می‌شود.

**تیپ F:** در سال ۱۹۷۸ فردی به نام اشنايدر یک تیپ حساس به حرارت از ASM را شناسایی نمود که آن را NPD-F نام‌گذاری نمود [۳ و ۶۹].

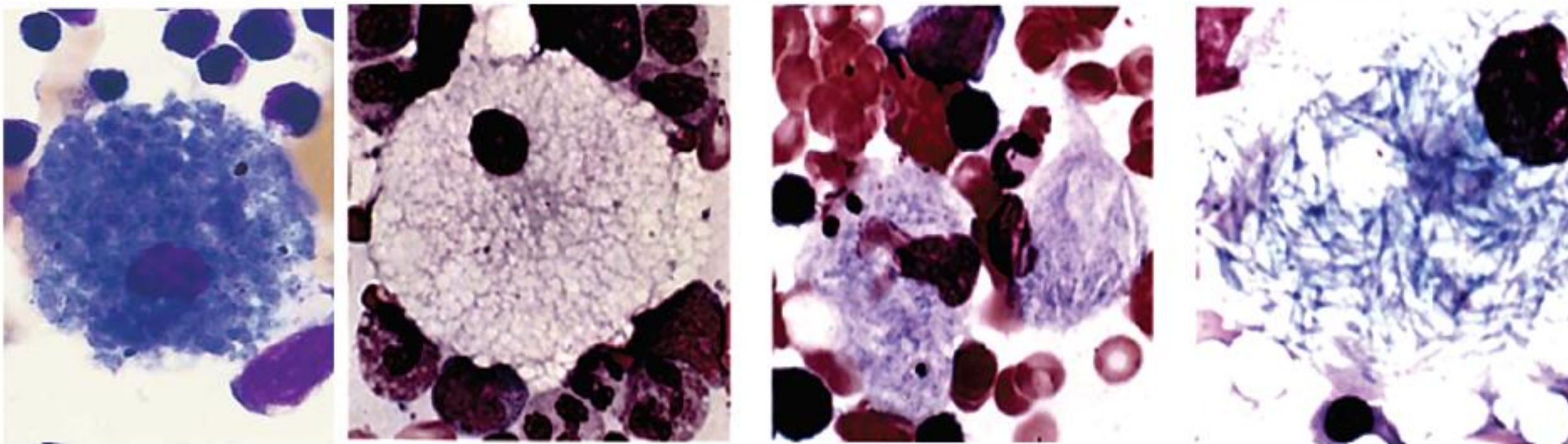
| <i>Manifestation</i>  | <i>Type I</i> | <i>Type II</i> | <i>Type III</i> |
|-----------------------|---------------|----------------|-----------------|
| Onset                 | 1 year        | < 1 year       | 2–20 years      |
| Hepatosplenomegaly    | ++            | +/-            | +               |
| Bone disease          | ++            | -              | +/-             |
| Cardiac valve disease | -             | -              | +               |
| CNS disease           | -             | +++            | +/-             |
| Oculomotor apraxia    | -             | +              | +/-             |
| Corneal opacities     | -             | +/-            | +/-             |
| Age at death          | 60–90 years   | < 5 years      | < 30 years      |



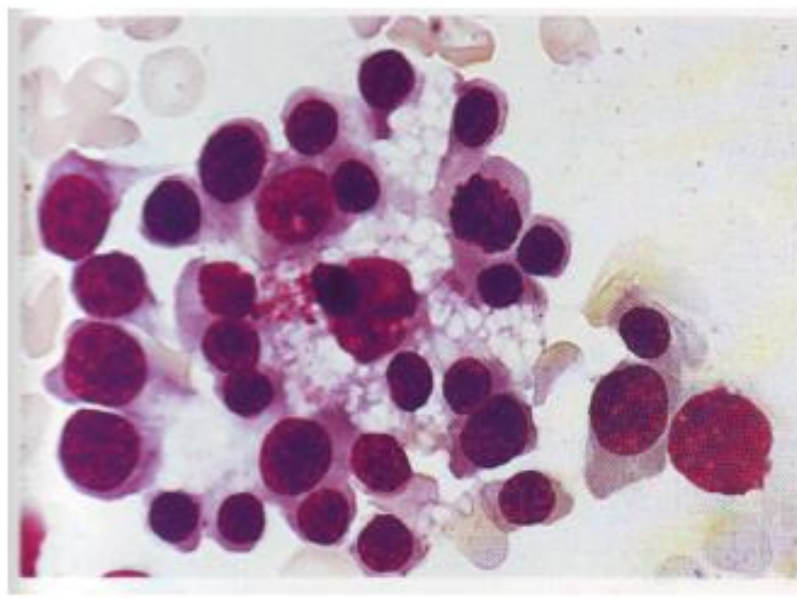
شکل ۱۶-۲۵: از راست، تصویر ۱ و ۲) سلول گوشه با واکنش مثبت نسبت به TRAP که تصویر دوم منظره رشته مانند و فیبریل را در یک سلول گوشه نسبتاً له شده نشان می‌دهد. ۳) واکنش مثبت منتشره نسبت به PAS و ۴) واکنش مثبت منتشره نسبت به رنگ آمیزی آهن



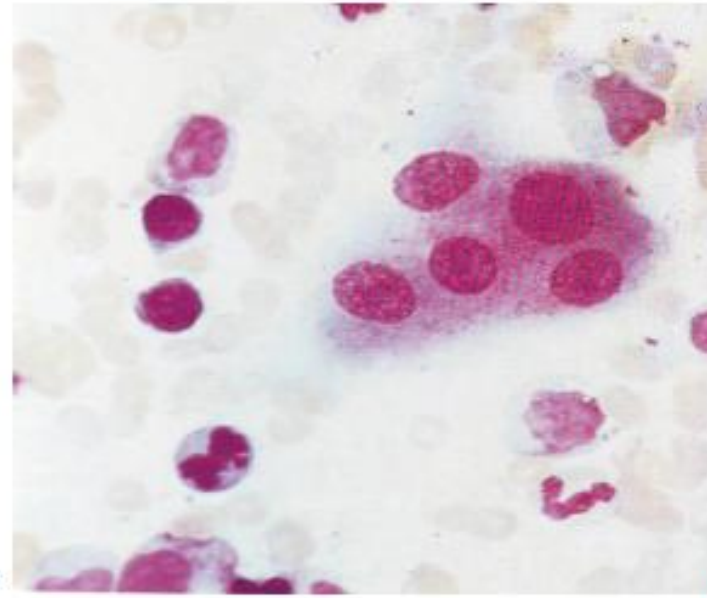
شکل ۱۳-۲۵: پیگمانتاسیون زرد-قهوه‌ای به همراه ناخنک ملتحمه چشم. (۲) هپاتواسپلنومگالی متوسط. (۳) ضایعات استخوانی شدید در فمور تحتانی که گسترش فضای استخوانی، نازک شدگی ضریع و چندین ناحیه انفارکتوس شده و اوستئوکروستیک به رنگ سفید را نشان می‌دهد. (۴) تغییرات اسکلتی در مفاصل بیمار مبتلا به گوشه تیپ I (تصویر MRI) [۵].



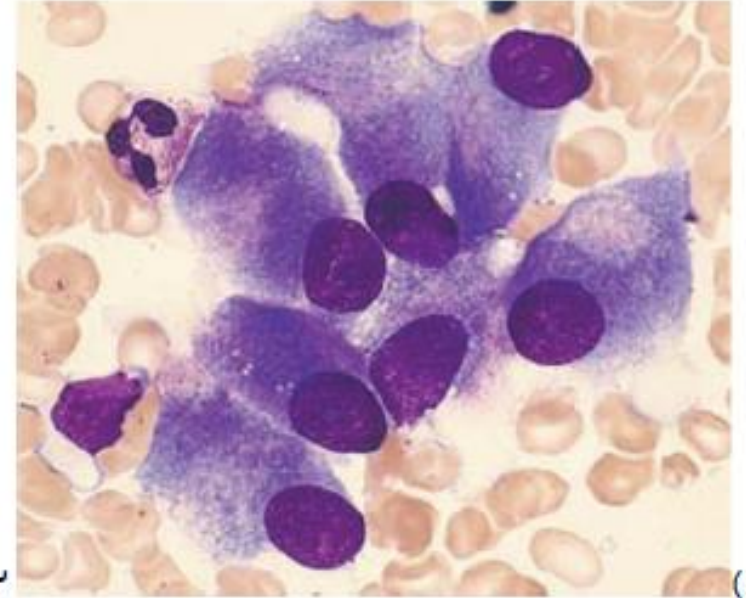
شکل ۲۶-۲۵: از راست به چپ: سلول گوشه، سودوگوشه، سلول نیمین پیک و هیستوسیت آبی دریا (واریانتی از نیمین پیک)



(۳)

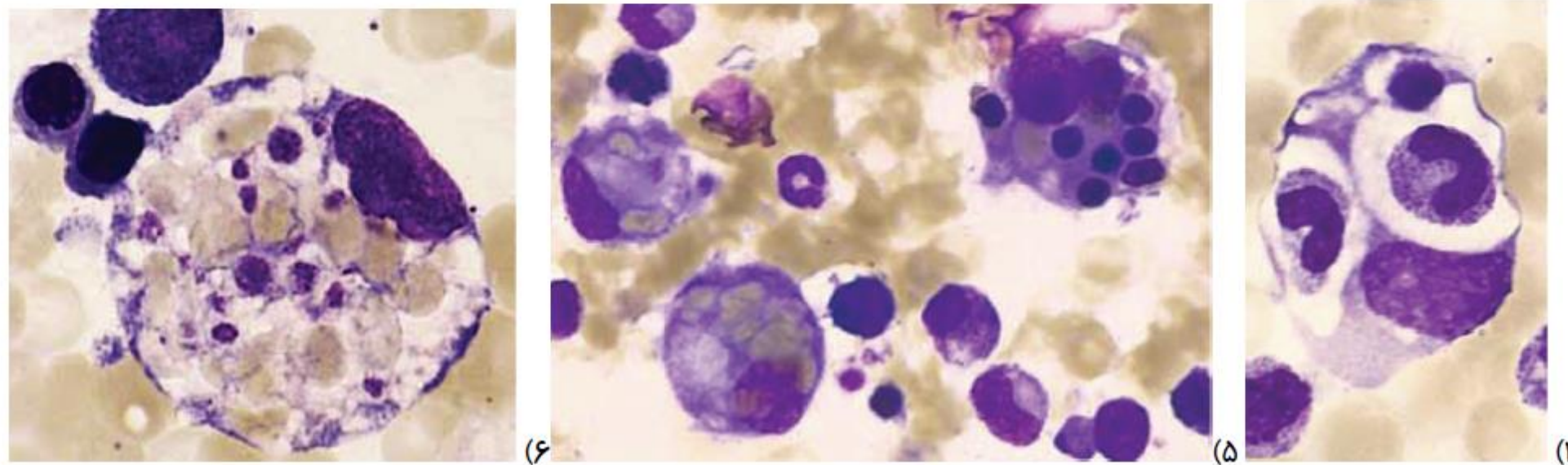
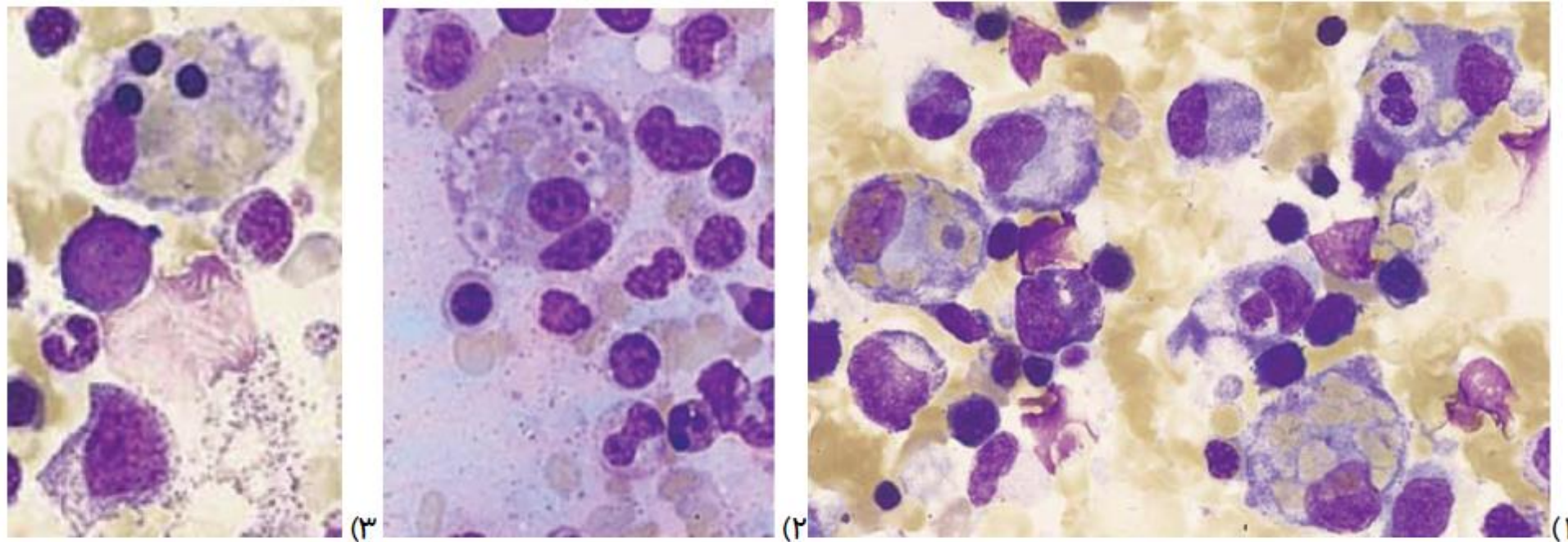


(۲)

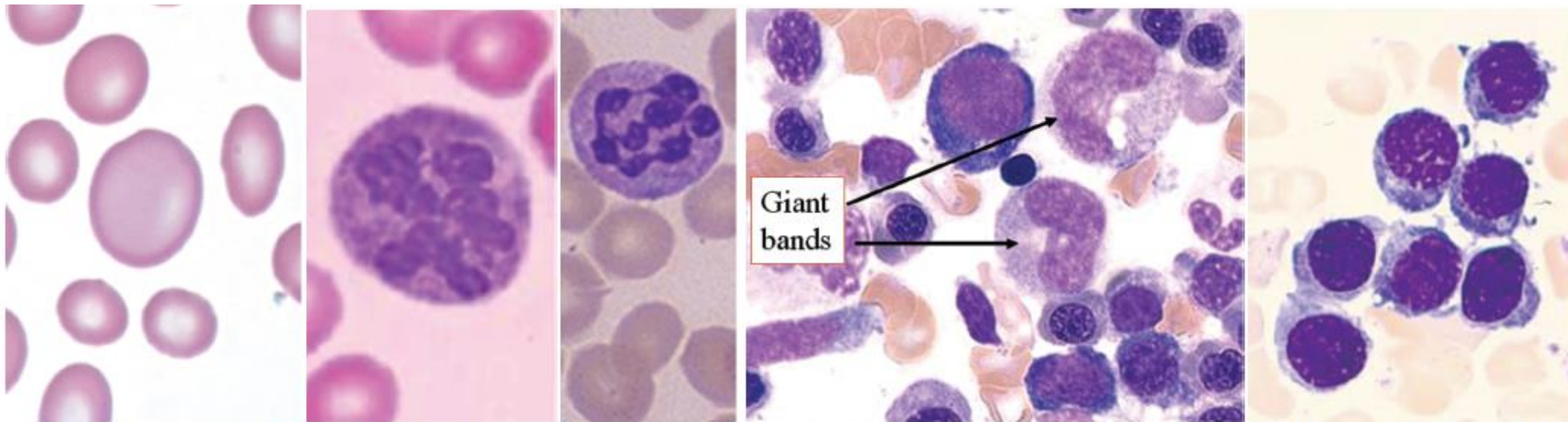


(۱)

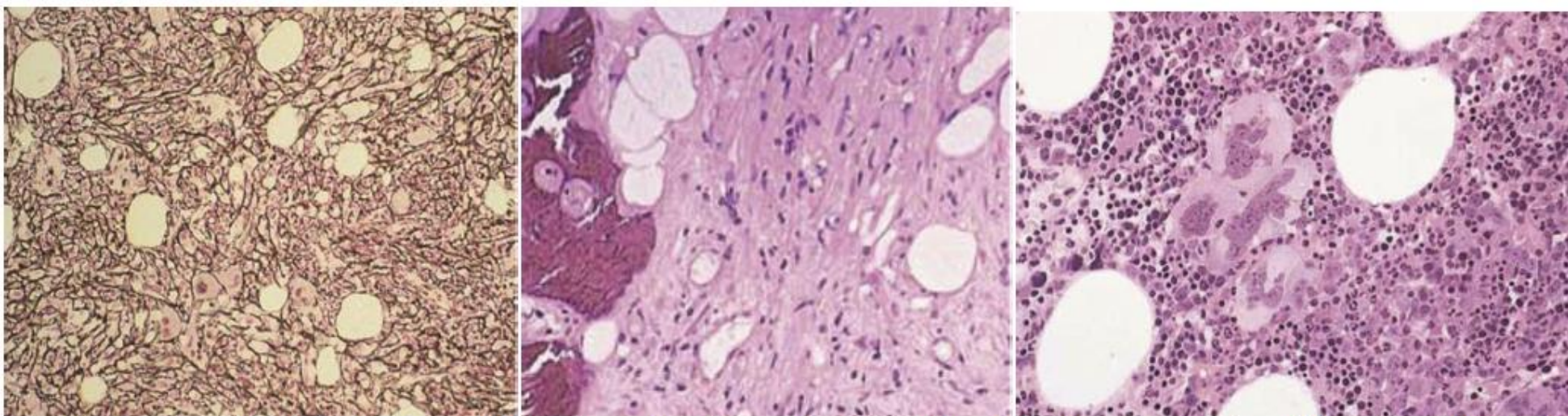
شکل ۲۶-۲۰: تصویر راست: سلول‌های اوستئوبلاست با مورفولوژی مشابه پلاسماسل که در کنار تراکولار استخوانی دیده می‌شوند. تصویر وسط: سلول‌های چند هسته‌ای اوستئوکلاست که شباهت بالایی با مگاکاریوسیت‌های چند هسته‌ای BM دارند ولی هسته‌های این سلول‌ها جدا از هم هستند. تصویر چپ: سلول‌های ماکروفاژ پرستار در جزایر اریتروبلستیک مغز استخوان [۲۹].



شکل ۲۵-۲۰: تصاویر مختلفی از هموفագوسیتوز توسط ماکروفاژهای هیستوسیتی BM که در آن هیستوسیت‌ها نوتروفیل (۱ و ۴)، RBC (اکثر تصاویر)، پلاکت (۲ و ۶) و بقایای هسته‌های نورموبلاستی (۳ و ۵) را فագوسیت کرده‌اند. گاهی فագوسیتوز به قدری زیاد است که هسته خود ماکروفاژ به یک گوشه از سلول کشیده می‌شود (۶). اغلب سلول‌ها بزرگ و کف آلود هستند ولی با سلول‌های ذخیره‌ای فرق دارند. بقایای اریتروسیت‌ها به صورت لکه‌های قرمز-قهوه‌ای در داخل هیستوسیت‌ها دیده می‌شوند [۲۹].

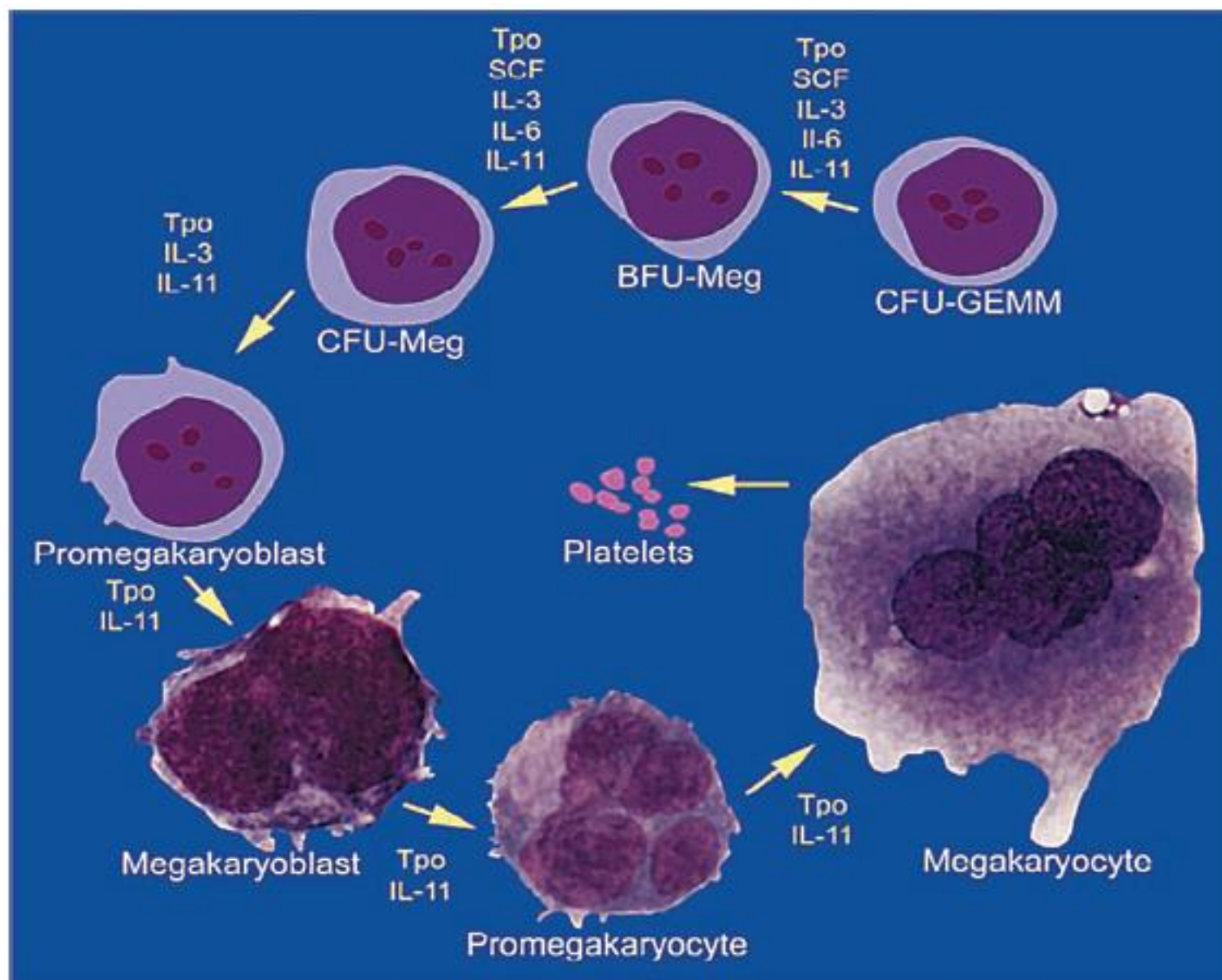


شکل ۴۱-۲۰: از راست به چپ: (۱) بازوفیلیک نورموبلاست‌های آبی، نسبتاً کوچک با دیواره ریش‌ریش و نامنظم در آنمی فقر آهن شدید، (۲) جایانت متامیلوسیت و بازوفیلیک نورموبلاست بزرگ در آنمی مگالوبلاستیک؛ در قسمت پایین شکل ۲، دو بازوفیلیک نورموبلاست نرمال نیز دیده می‌شوند. (۳ و ۴) دو نوتروفیل هیپرسمگماته یا ماکروپلی‌سیت با بیش از ۸ لوبول هسته و (۵) ژیگانتوسیت یا ماکروسیت بسیار بزرگ در آنمی مگالوبلاستیک یا پریشیوز.

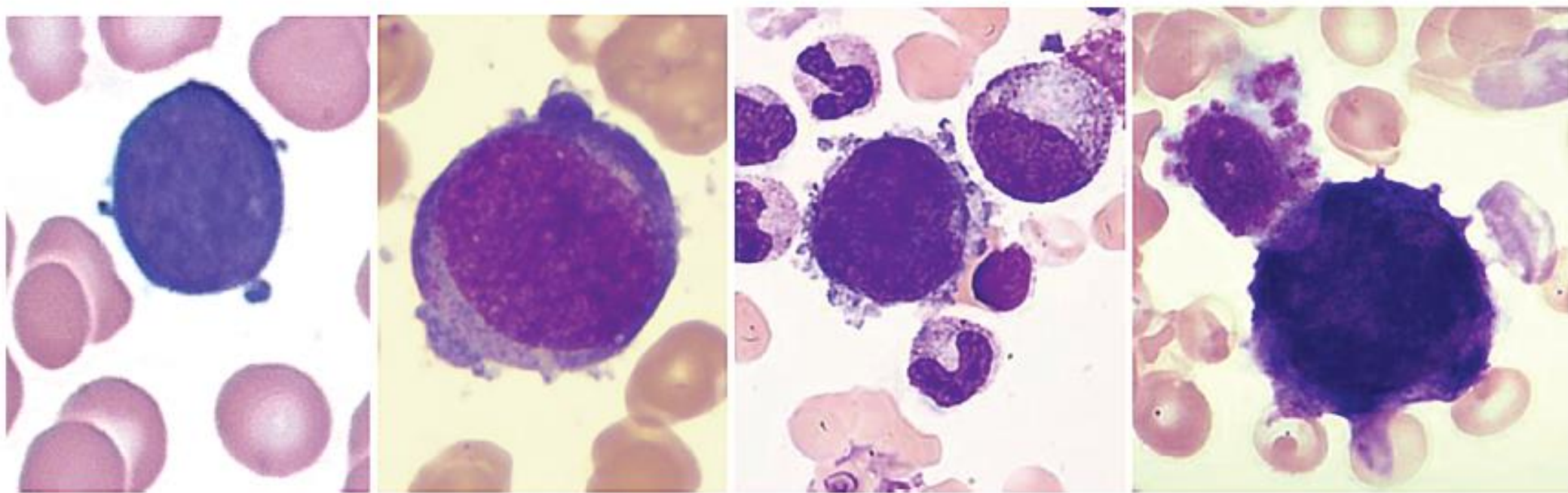


شکل ۴۵-۲۰: راست: بیوپسی BM در بیمار مبتلا به میلو فیبروز که افزایش سلولاریته، کاهش آدیپوسیت‌ها به ۱۵٪ و تجمعات مگاکاریوسیتی بزرگ را در فاز اولیه بیماری نشان می‌دهد. با پیشرفت بیماری و فیبروز شدید BM خون‌سازی اکسترا مدولاری فعال و BM مملو از رشته‌های رتیکیلینی می‌شود که با رنگ آمیزی نقره مشخص می‌شود. مگاکاریوسیت‌ها در لابه‌لای رشته‌های فیبروزی قرار دارند [۲۹].

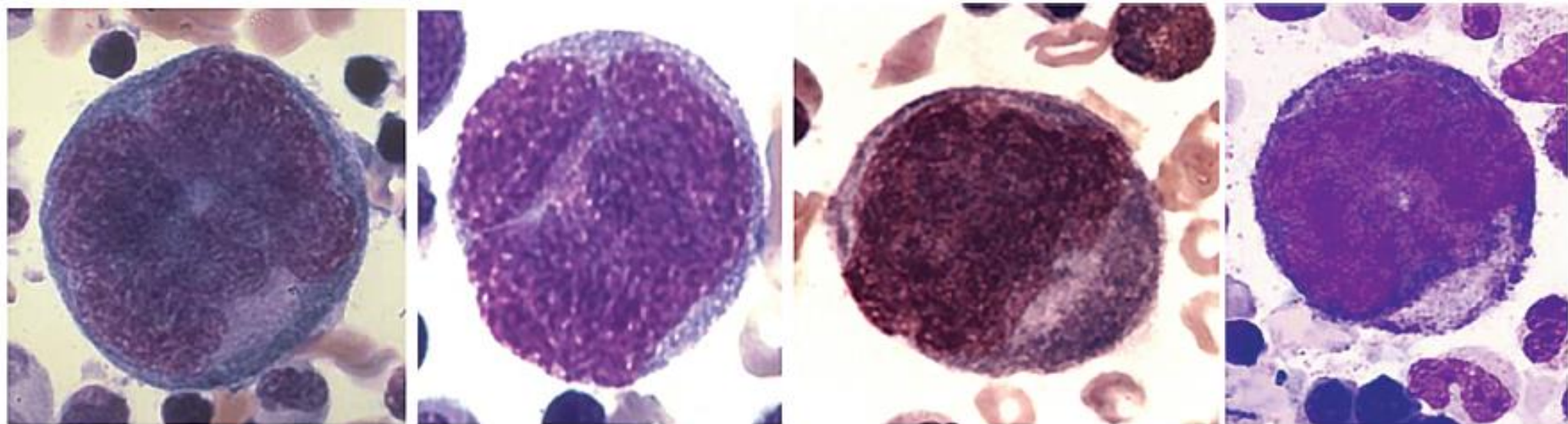
# Megakaryopoiesis & Thrombopoiesis



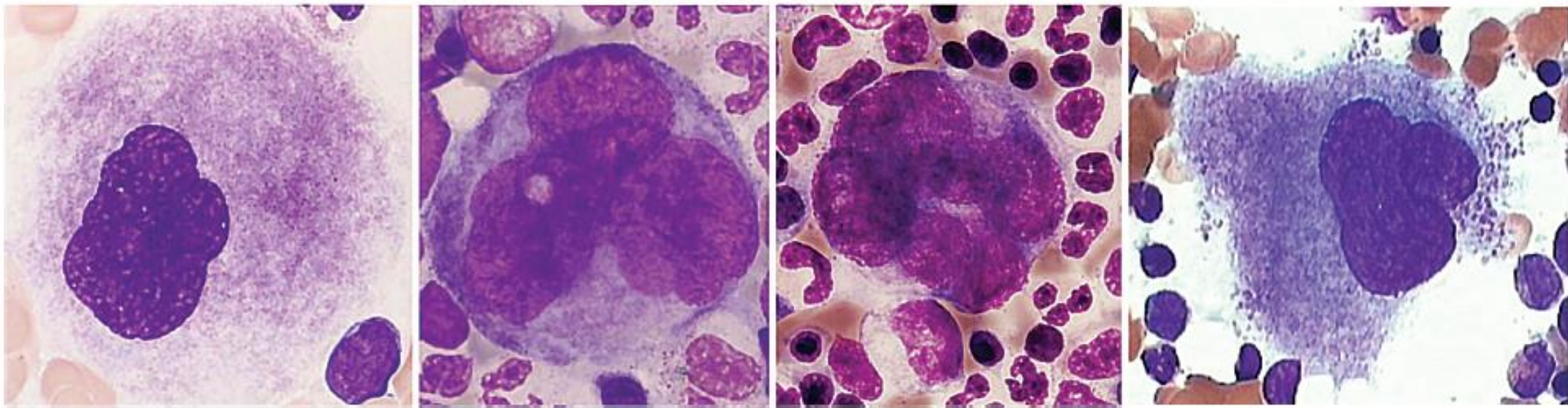
شکل ۱-۲۶: سیر تکاملی رده پلاکتی و فاکتورهای رونویسی (A) و فاکتورهای رشد مختلف (B) که در مسیر ترومبوپوئز حائز اهمیت هستند [۱۵]



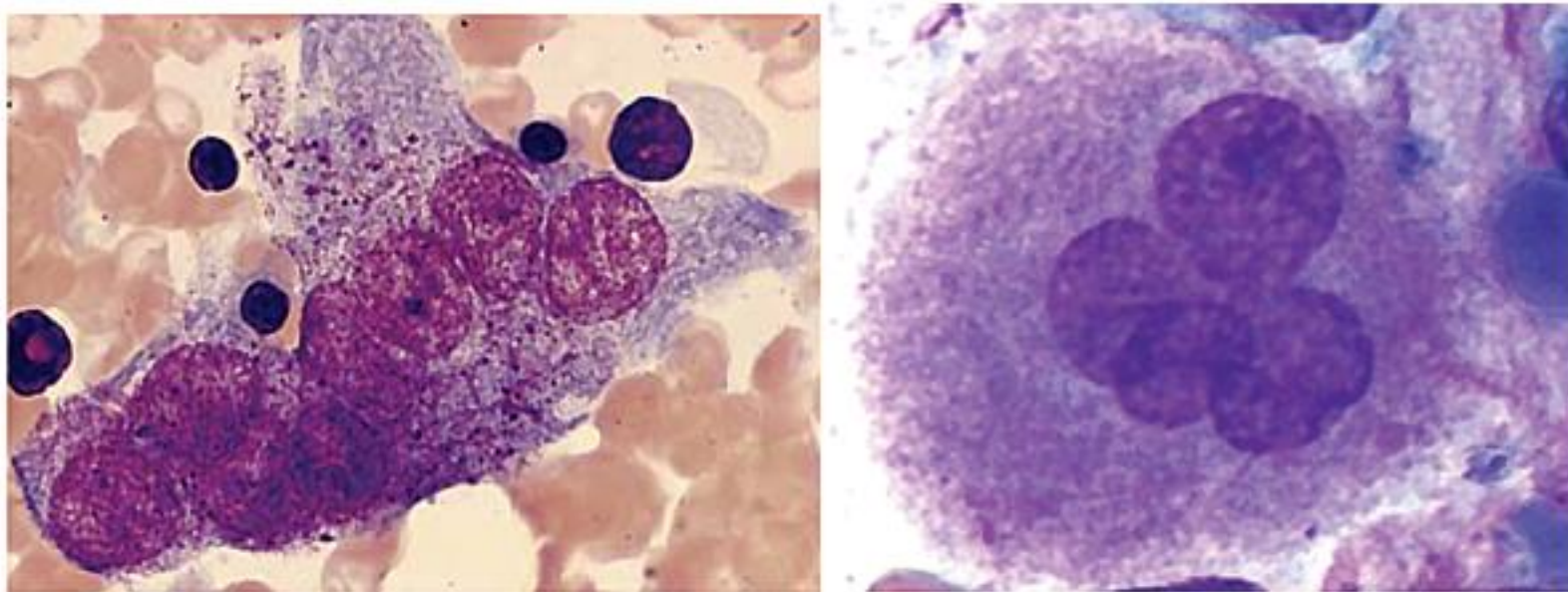
شکل ۷-۲۶: مگاکاریوبلاست ( $2n$ ) غیر لوبوله، با سیتوپلاسم بازوفیلیک، N/C بالا و سیتوپلاسم نارس



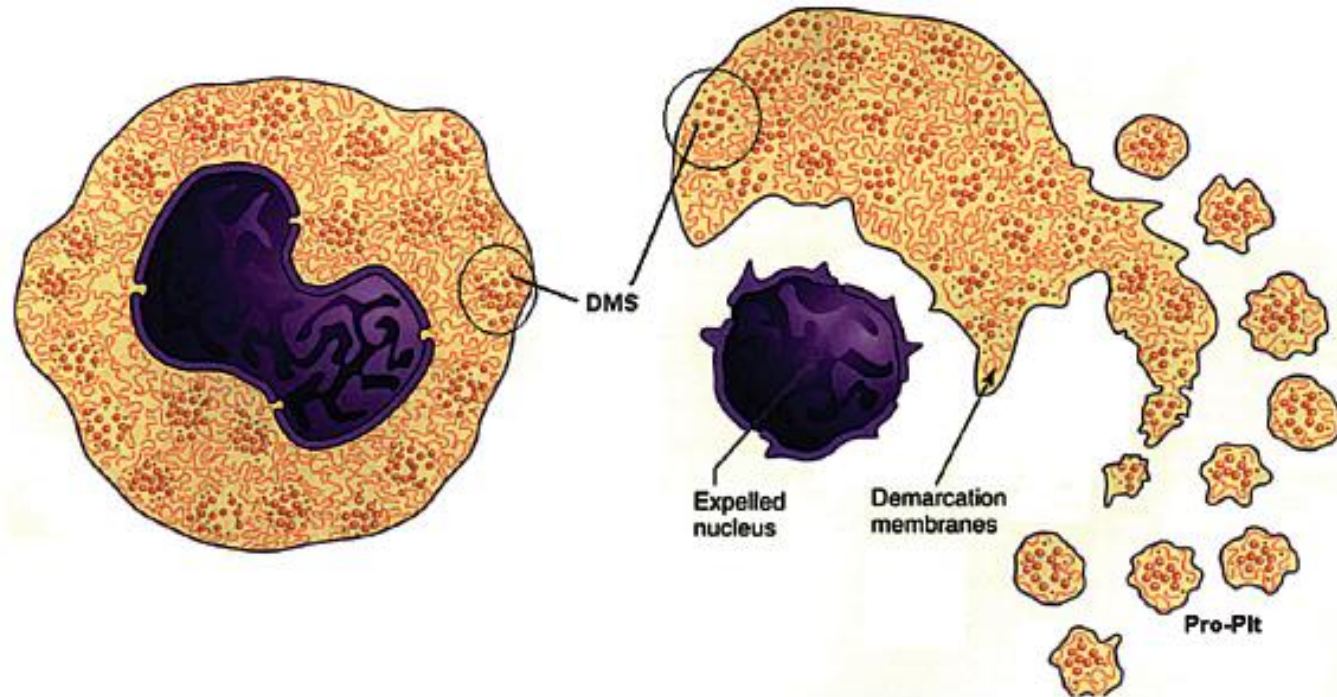
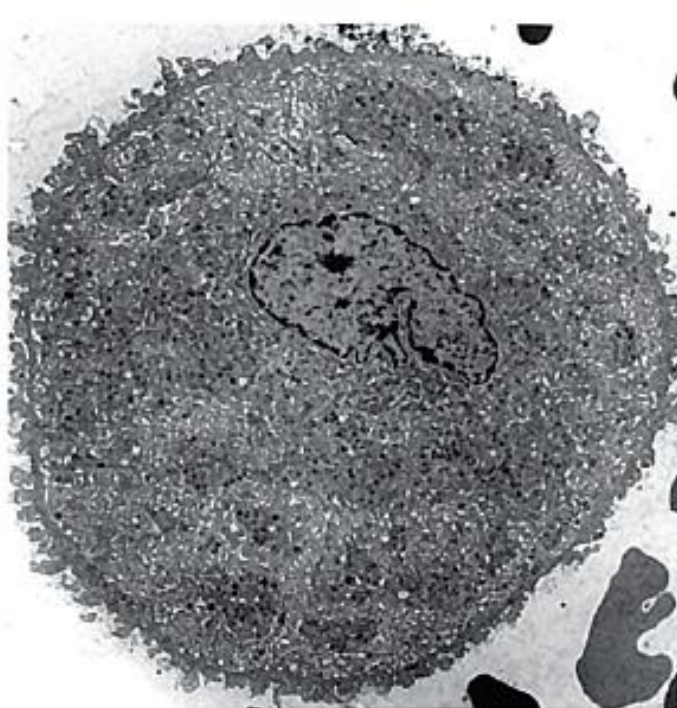
شکل ۸-۲۶: پرو مگاکاریوسیت یا سلول MK-II پلی پلوئید ( $4n$ ) با N/C بالا، لوبولاسیون و DMS ناچیز، سیتوپلاسم آبی و کم



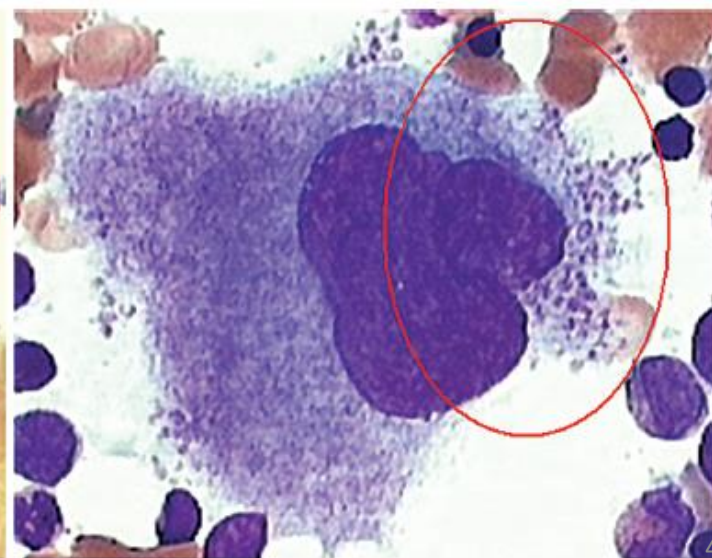
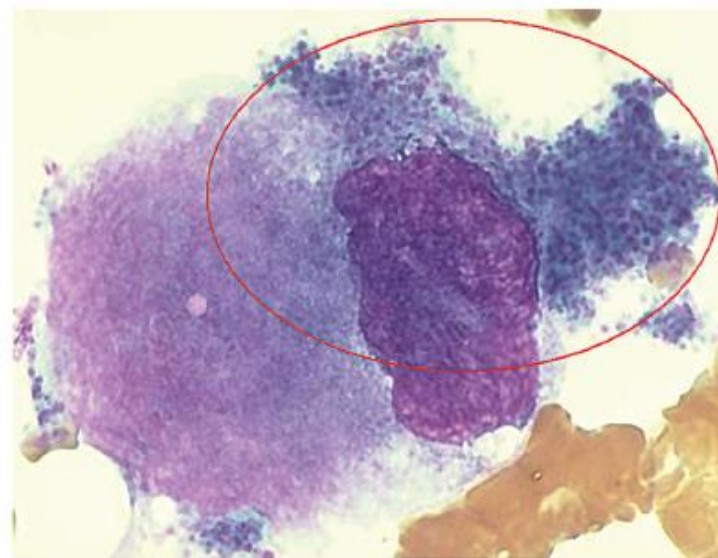
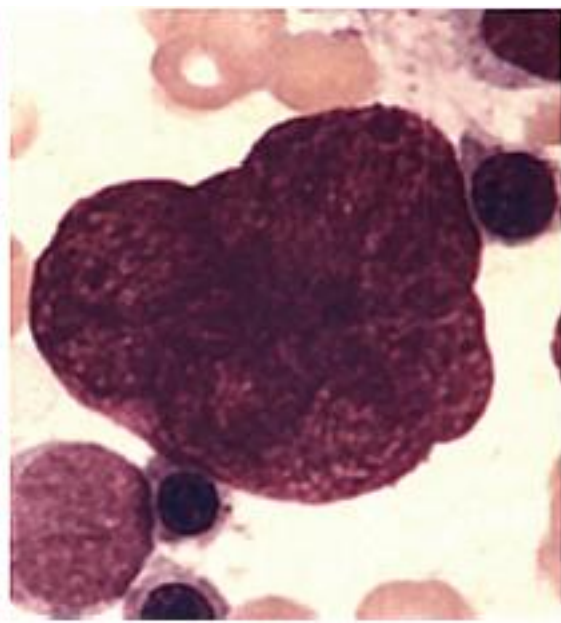
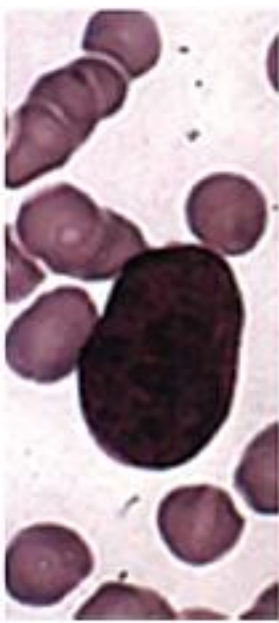
شکل ۹-۲۶: انواع مگاکاریوسیت بالغ نوع MK-III که بسیار بزرگ، چند لوبوله یا چند هسته‌ای، اسیدوفیلیک با حاشیه‌ای نامنظم و در حال تولید پلاکت و پروپلاکت می‌باشد.



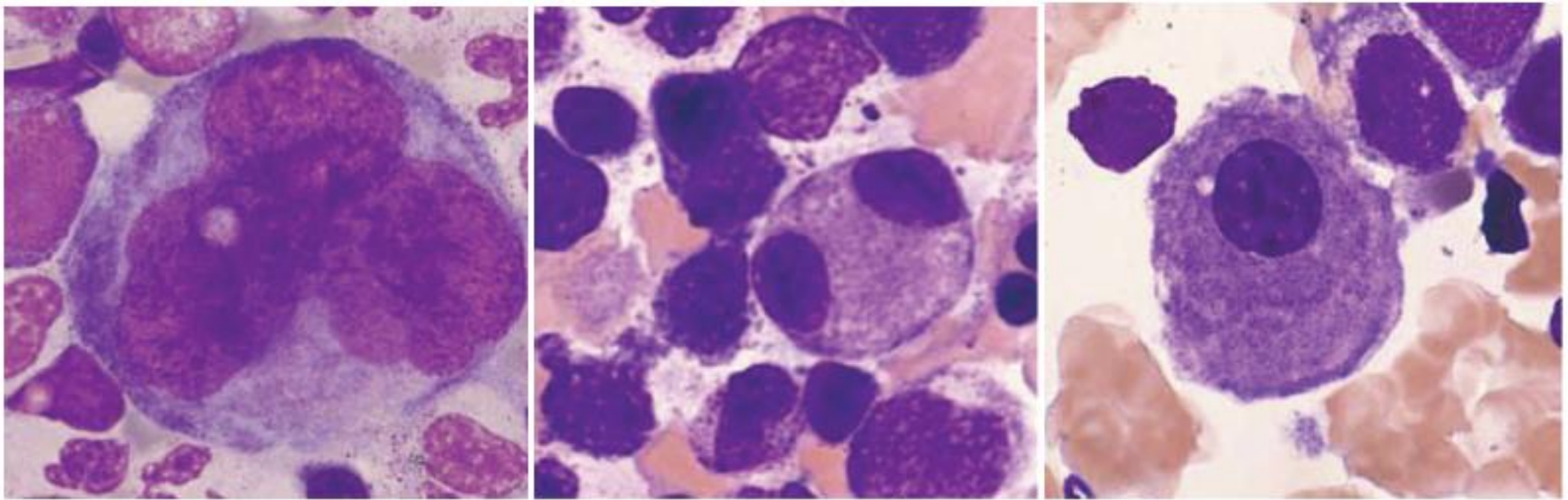
شکل ۱۰-۲۶: تفاوت‌ها و شباهت‌های یک مگاکاریوسیت بالغ با یک اوستنو کلاست



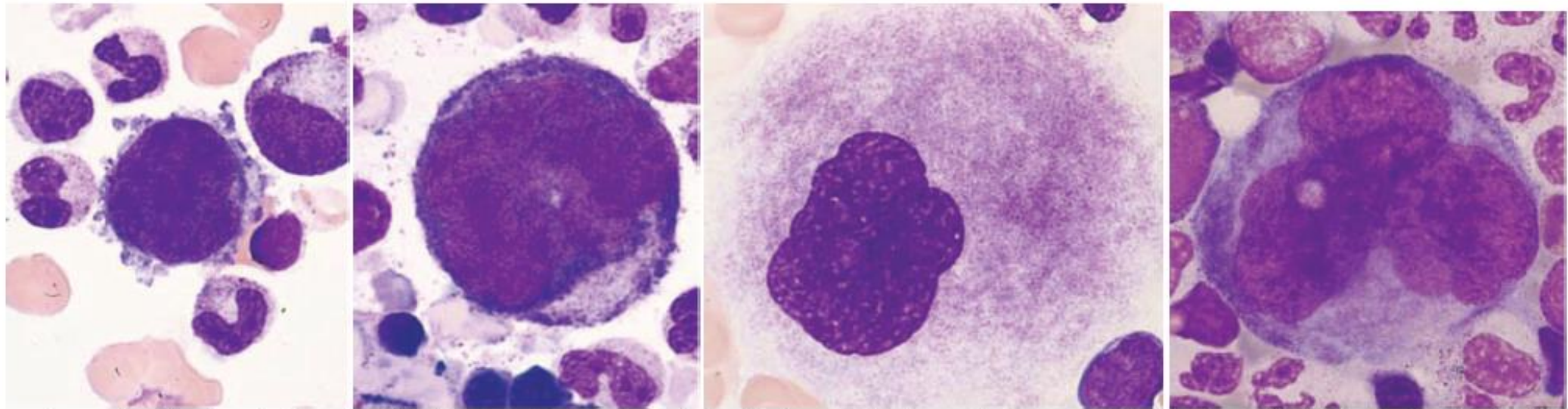
شکل ۶-۲۶: مگاکاریوسیتی با سیستم کامل DMS که منشاء پروپلاکت‌ها و پلاکت‌های خون محیطی محسوب می‌شوند [۲۰].



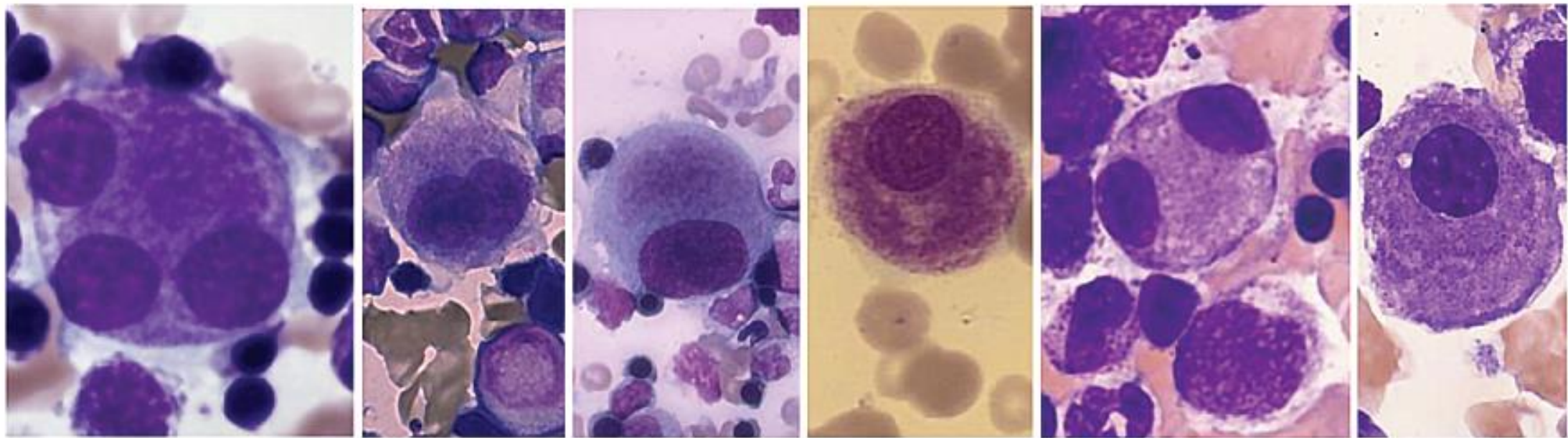
شکل ۱۸-۲۶: تشکیل DMS و جدا شدن پلاکت‌ها و پروپلاکت‌ها از مگاکاریوسیت‌های بالغ و غول پیکر BM [۲۵]



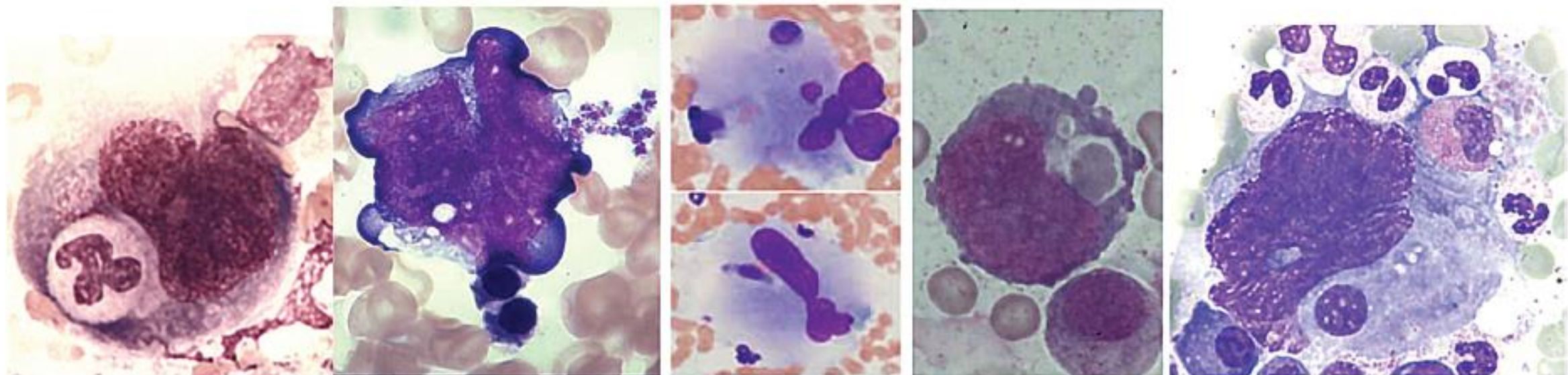
شکل ۴۴-۲۰: تصویر راست و وسط: میکرومگاکاریوسیت تک هسته‌ای و ندرتاً دوهسته‌ای با کروماتین یکنواخت و هموژن بنفش. تصویر چپ: مگاکاریوسیت طبیعی و چند هسته‌ای



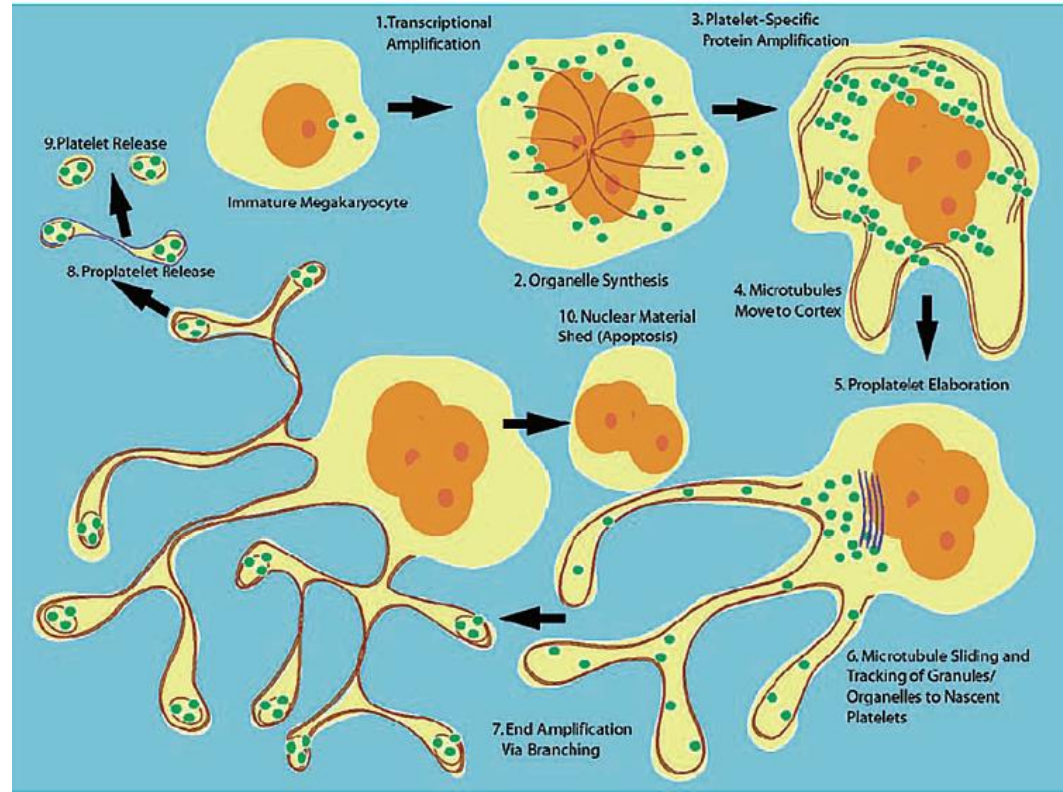
شکل ۲۰-۲۰: تصاویر مختلف از مگاکاریوبلاست و مگاکاریوسیت‌های تک هسته‌ای یا چند هسته‌ای با لوپول‌های متصل به یکدیگر و پلاکت‌هایی که همانند شماره‌های ساعت از دیواره سیتوپلاسم منشعب



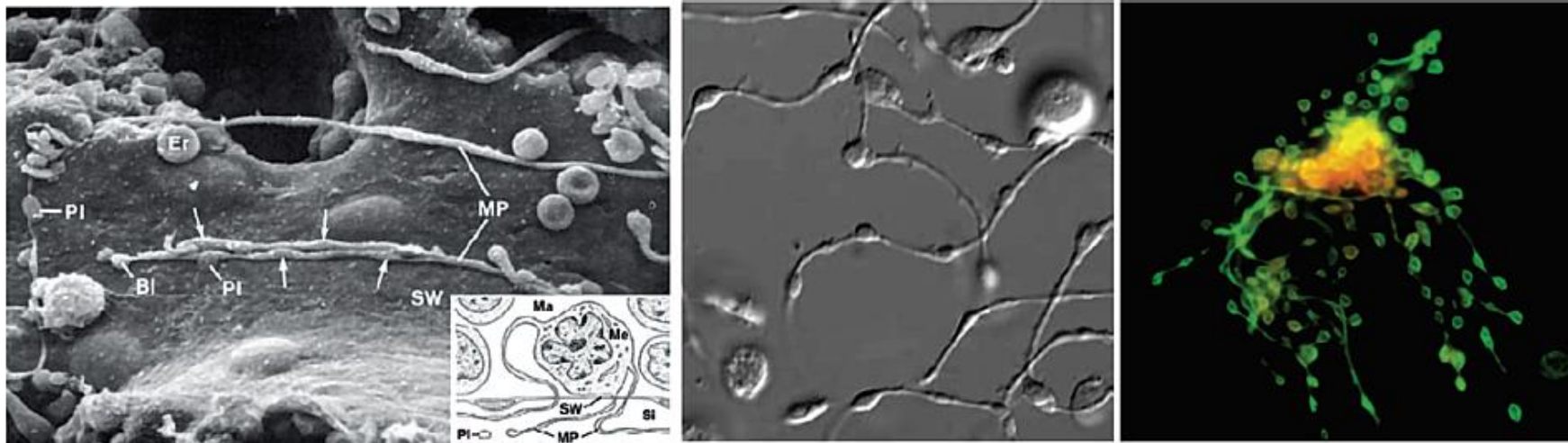
شکل ۱۹-۲۶: تصاویر مختلفی از انواع میکرومگاکاریوسیت (میکروکاریوسیت)



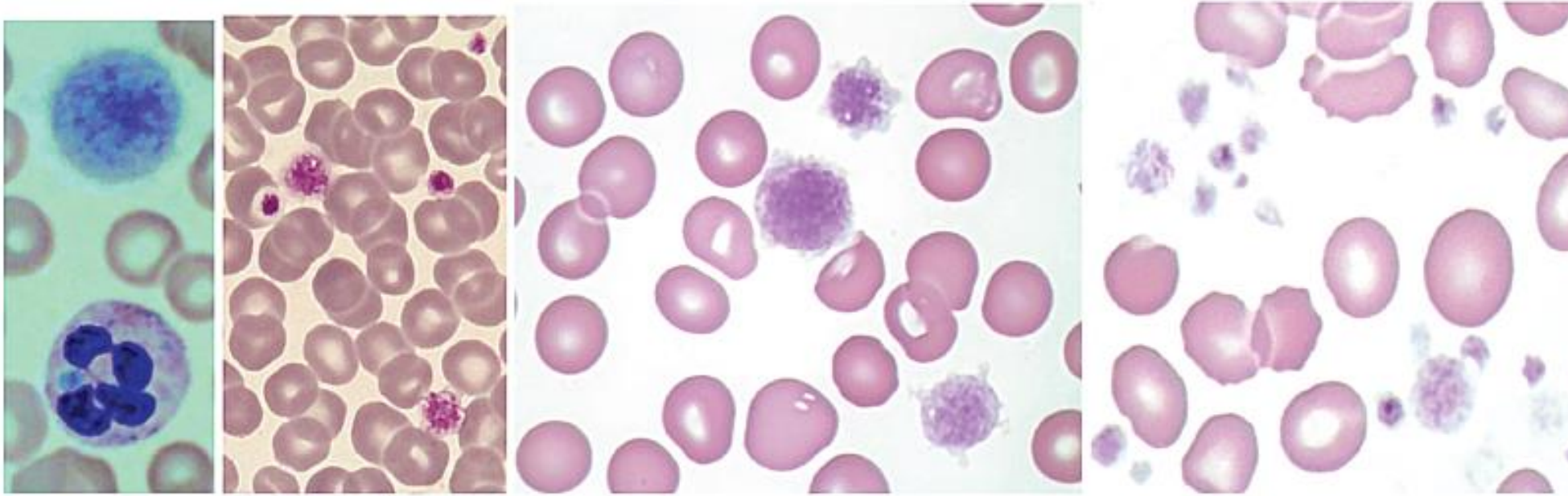
شکل ۲۰-۲۶: امپریوپولسیس لکوسیت‌ها و اریتروسیت توسط مگاکاریوسیت



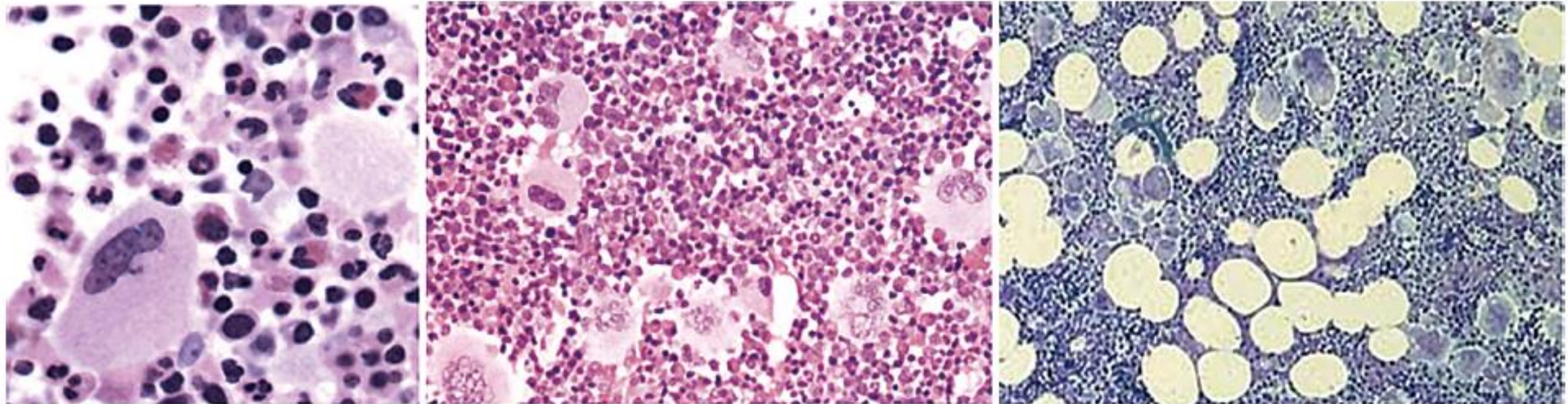
شکل ۱۱-۲۶: مراحل تشکیل پروپلاکت و پلاکت از مگاکاریوسیت [۱۵]



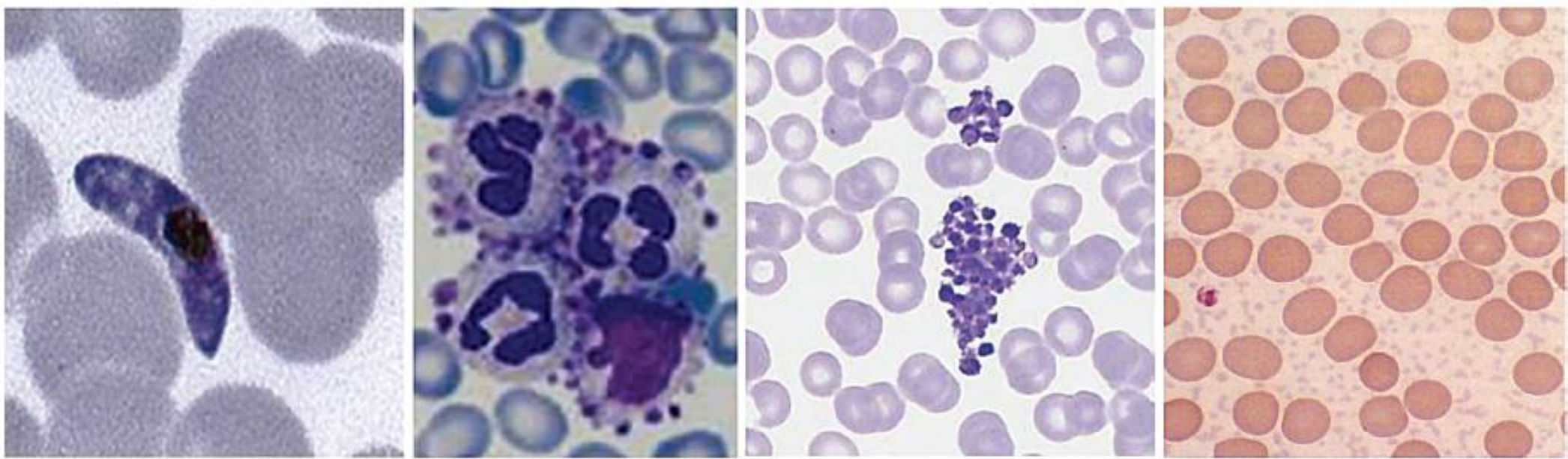
شکل ۱۲-۲۶: تصویر SEM و میکروسکوپ فلورسانت از پروپلاکت‌های اولیه که شکلی میسیلیوم یا جوانه ماندی را ایجاد می‌کند. در این روش از تیزول نارنجی استفاده می‌شود که با اتصال به RNA پروپلاکت‌ها شدت فلورسانت ۳۰۰۰ برابری را در مقایسه با پلاکت‌های بالغ ایجاد می‌کند [۱۵].



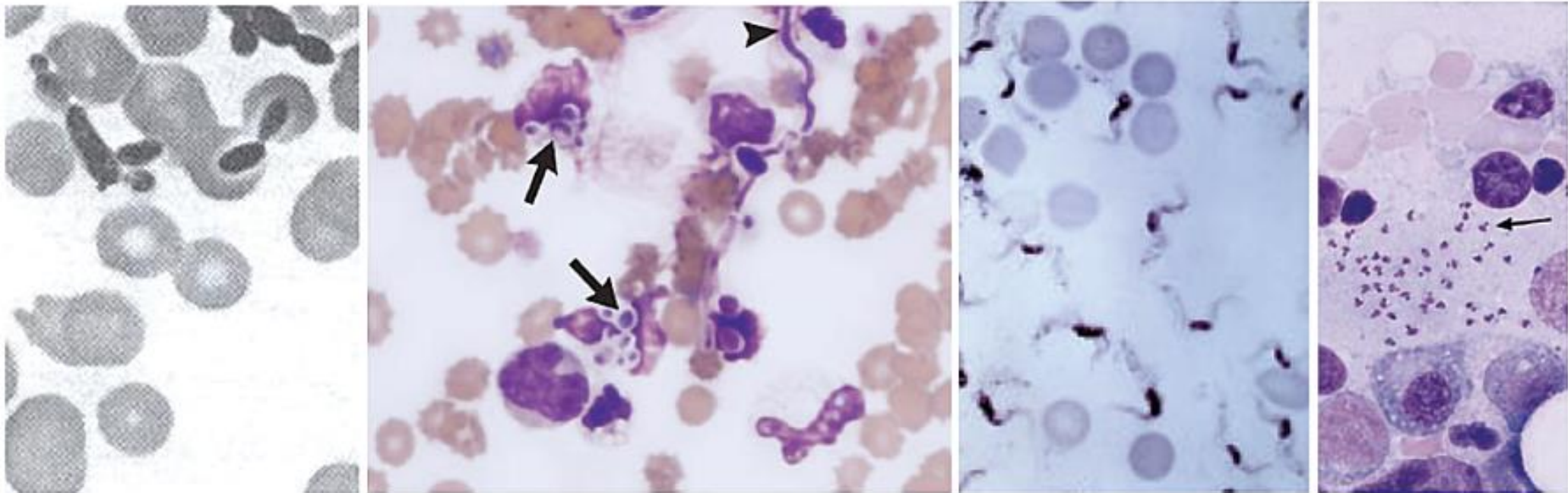
شکل ۱۳-۲۶: جایانت پلاکت‌های بزرگ در گستره خون محیطی بیمار مبتلا به ITP و آنومالی می‌هگلین



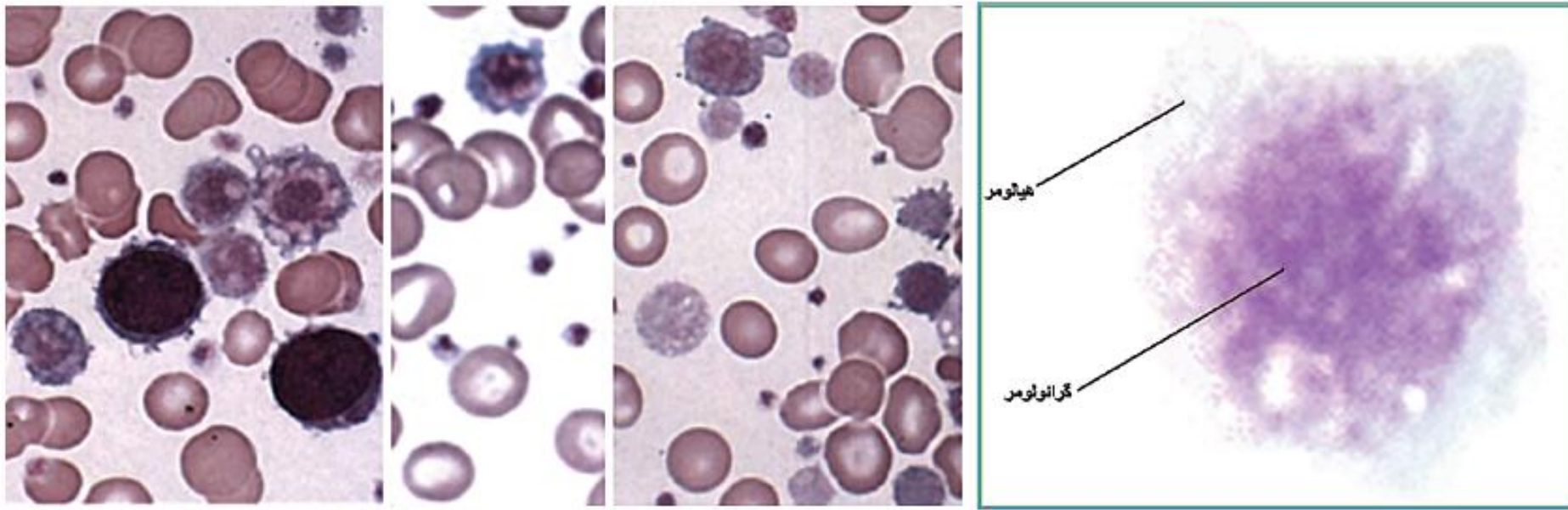
شکل ۱۶-۲۶: حضور مگاکاریوسیت‌های بزرگ و متمایز در بیوپسی از BM



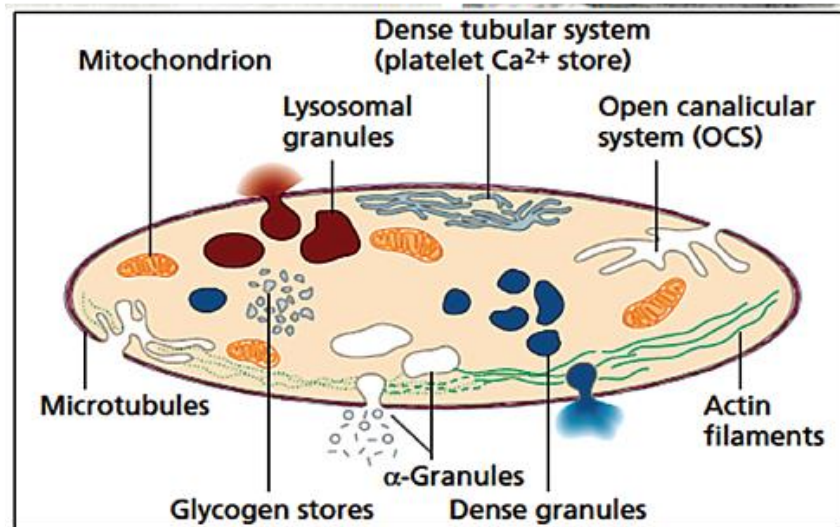
شکل ۲۱-۲۶: از راست به چپ: کرایو گلوبولینمی، میکرواگر گاسیون، ستلاتیتسم (پلاکت اقماری) و گامت مالاریا در خون محیطی که ممکن است در شمارش پلاکت تداخل ایجاد کنند.



شکل ۲۲-۲۶: از راست به چپ: لیشمانیا، تریپانوزوما، کاندیدیا آلیکنس در خون محیطی که ممکن است در شمارش پلاکت تداخل ایجاد کنند.

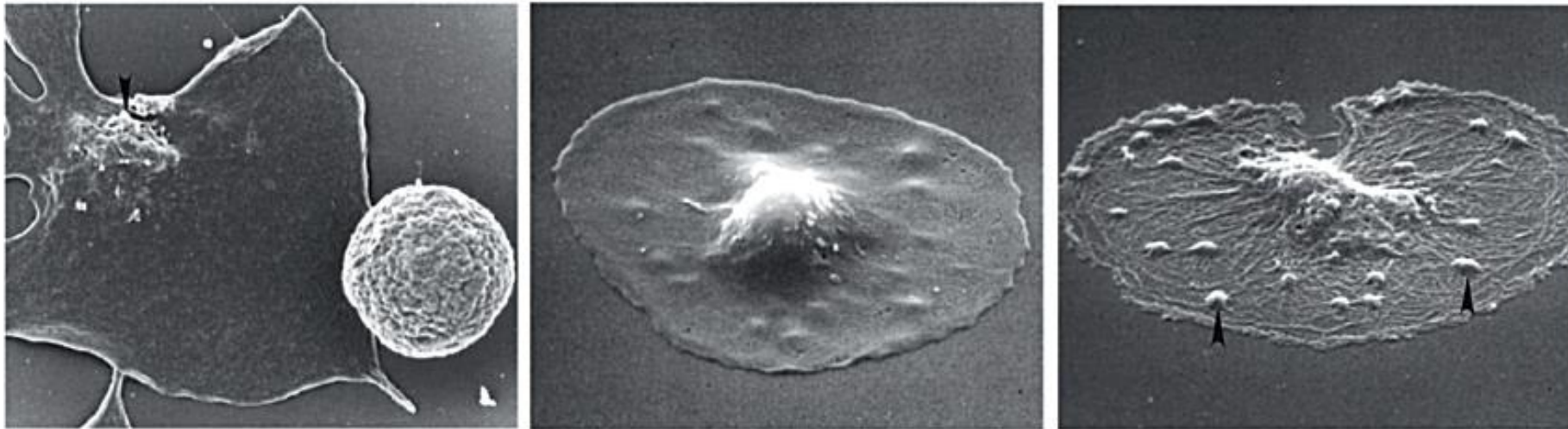


شکل ۲۵-۲۶: منظره دو قسمتی از پلاکت متصل به لام که در آن ناحیه هیالومر جدای از گرانولومر دیده می‌شود. این حالت نه تنها در مورد پلاکت‌های معمولی بلکه در مورد جایانت پلاکت‌های بزرگ نیز مشاهده می‌شود که ندرتاً در چنین مواردی ممکن است با لنفوسیت نیز اشتباه گرفته شوند. در تصویر سمت چپ دو مگاکاریوسیت کوتوله با پلاکت‌هایی که در حال انشعاب از آن هستند، نیز مشاهده می‌شود.

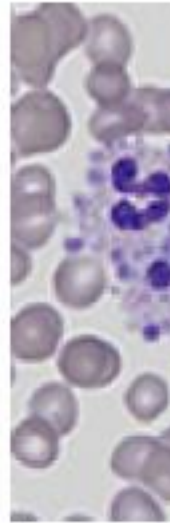




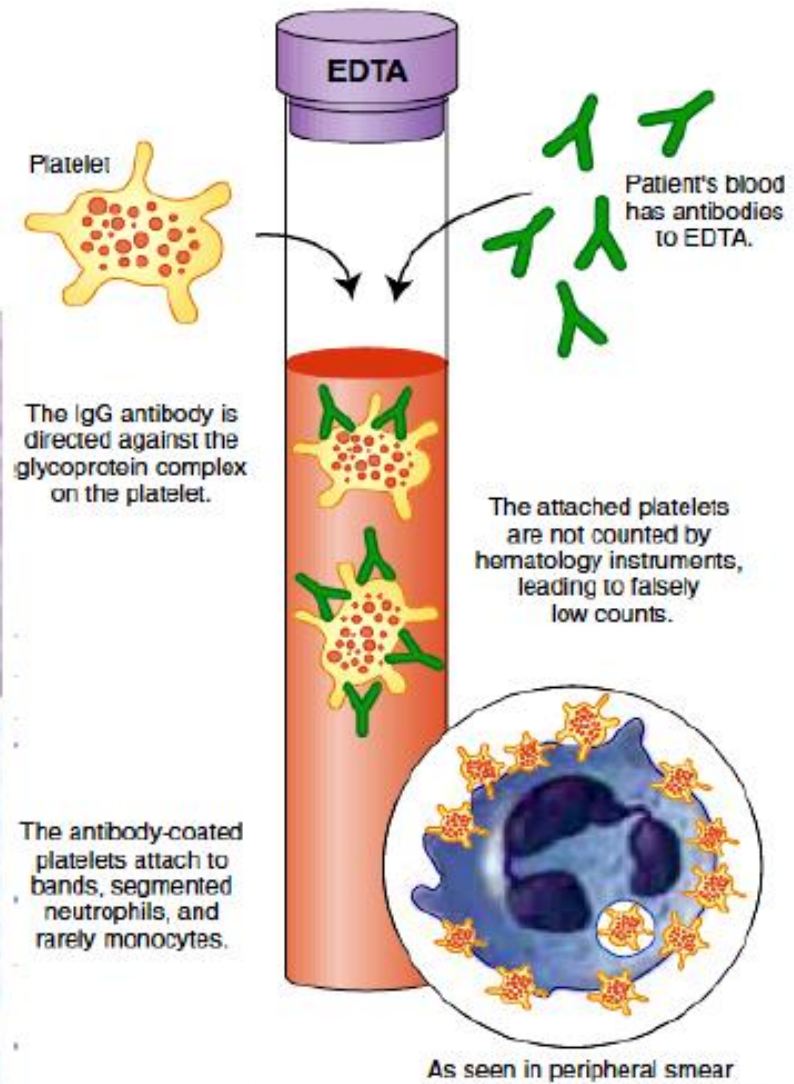
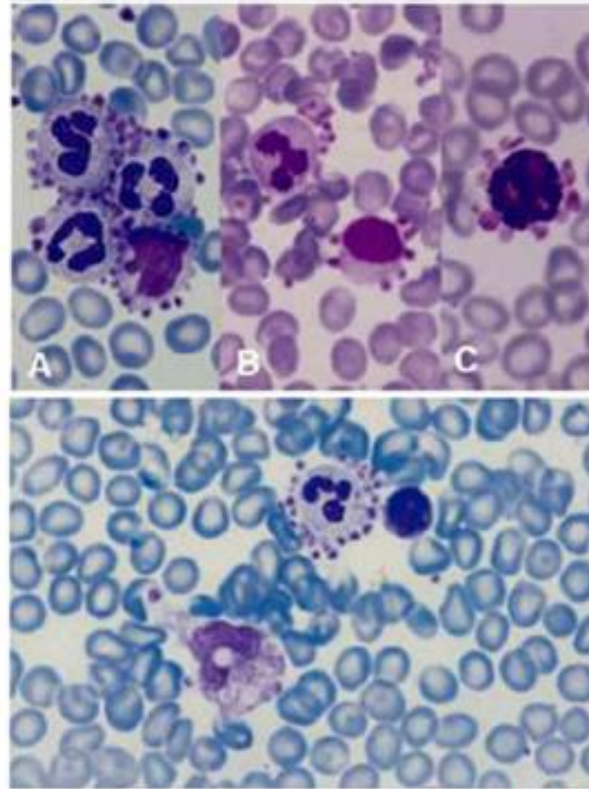
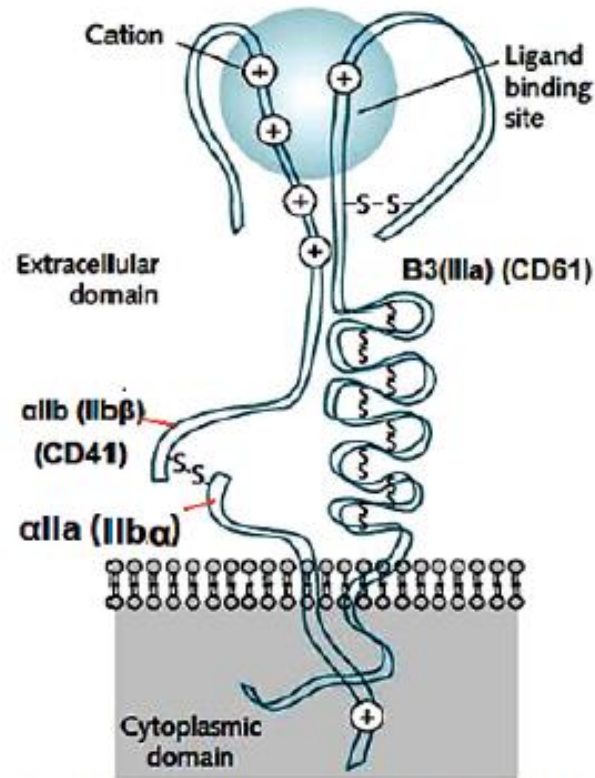
شکل ۲۶-۲۶: تصویر پلاکت در سه فرم دیسکوئید (غیر فعال)، دندریتیک فرم (نیمه فعال) و فرم مسطح یا نیمرو مانند (فعال) که همان طوری که مشهود است گلیکوکالیکس در فرم دیسکوئید آن زیر، ضخیم و شبیه مغز دیده می شود [۱۵].



شکل ۲۶-۲۷: پلاکت فعال و نیمرو مانند (شبیه کلاه مکریکی) متصل به سطح لام که به دو ناحیه گرانولومر (توده گرانول دار مرکزی) و هیالومر تبدیل می شود. در شکل سمت راست دگرانولاسیون ناقص گرانول های هیالومر در اثر مصرف داروی آسپرین و اختلال در مسیر سیکلواکسیژناز نشان داده شده است [۱۵].

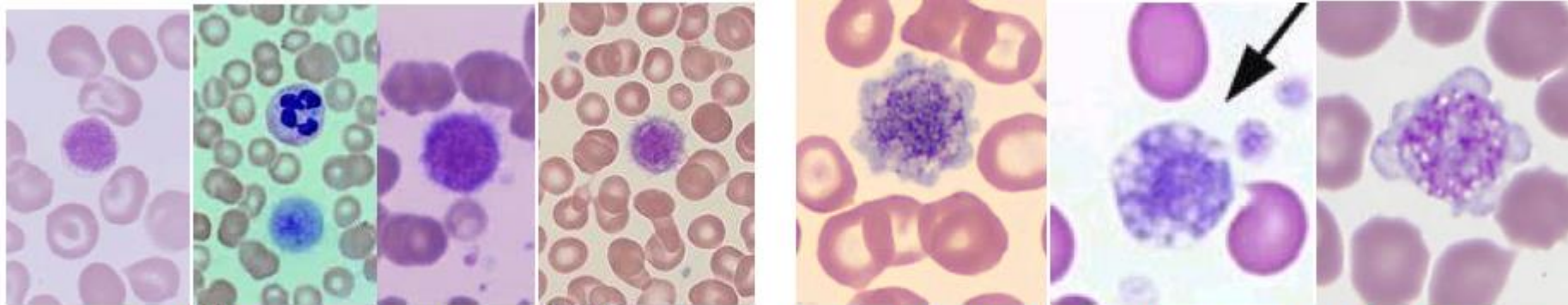


ای پلاکتی CD41.

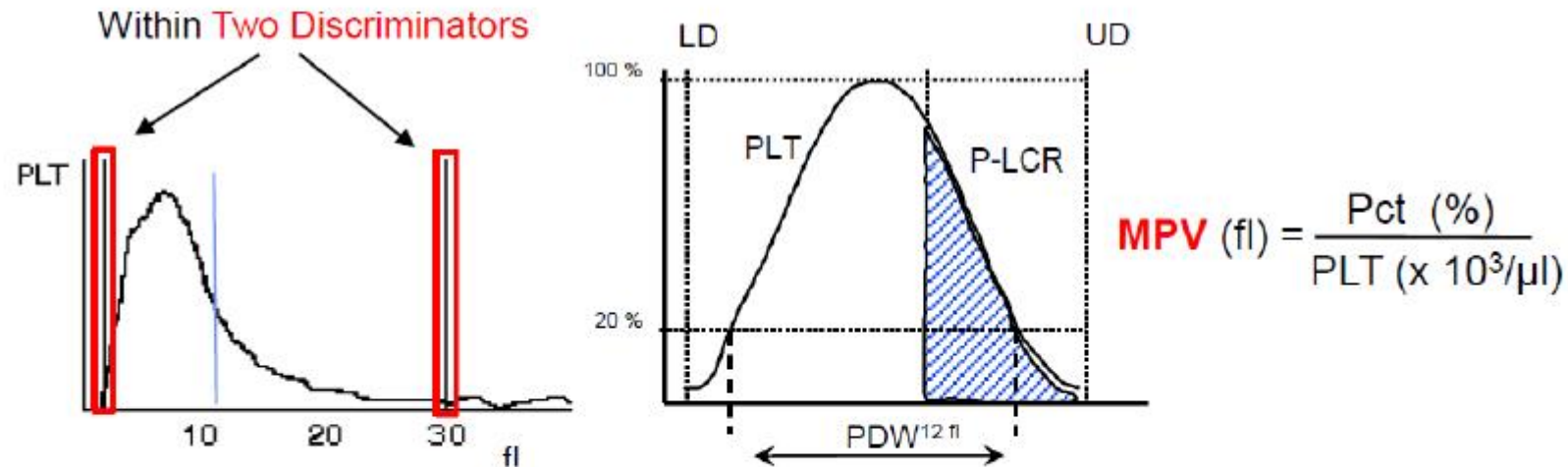


شکل ۳۶  
و CD42

شکل ۳۷-۱۰: پدیده ستلایتسم ناشی از حضور آنتی‌بادی ضد EDTA-GP-IIb/IIIa و فاگوسیت پلاکت‌ها توسط مونوسیت یا نوتروفیل که گاهی به صورت واکوئولاسیون مشاهده می‌شود. این آنتی‌بادی به صورت طبیعی در بدن برخی از افراد بر علیه برخی از پاتوژن‌ها یا فلورنرمال‌های رودهای تشکیل شده و زمانی که EDTA (اتیلن دی آمین تترا استیک اسید) با خاصیت آنیونی خود به دومن کاتیونی GP-IIb/IIIa متصل و باعث ظهور نئو آنتی‌ژن در آن می‌شود، به GP-IIb/IIIa تغییر یافته در سطح پلاکت متصل شده و به طریقی پلاکت را اوپسونیزه می‌کند. در مرحله بعد این آنتی‌بادی-های متصل به پلاکت از طریق دم Fc خود به FCγR سطح لکوسیت‌ها (نوتروفیل، لنفوسیت، مونوسیت، بازوفیل و انوزینوفیل) و حتی دیگر پلاکت‌های FCγR+ متصل شده و باعث بروز ستلایتسم (استقرار پلاکت‌ها پیرامون لکوسیت‌ها) و اگر گاسیون پلاکتی می‌شوند. البته استفاده از سیترات سدیم باعث بروز فرایند فوق نشده و لذا ستلایتسمی ایجاد نمی‌شود.



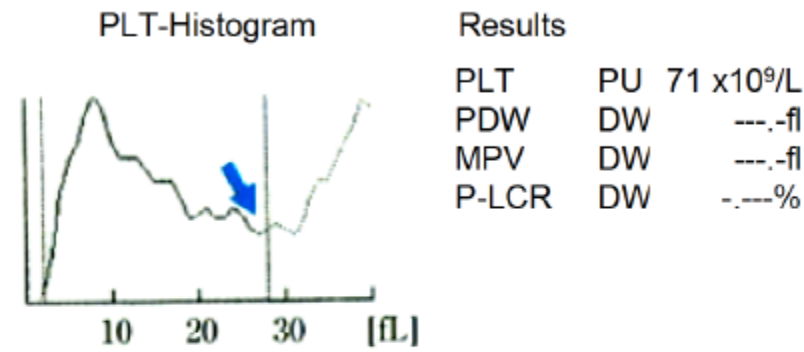
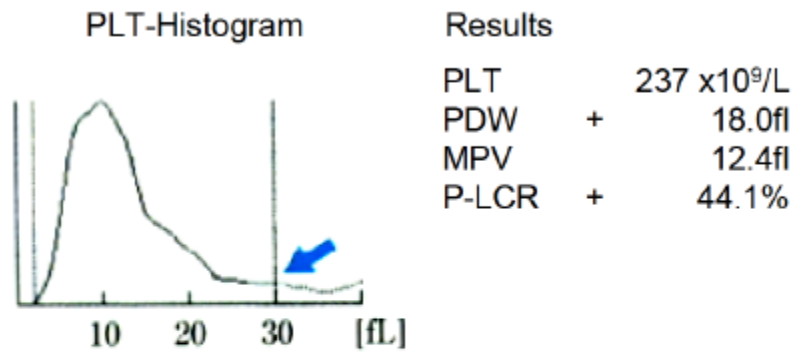
شکل ۳۸-۱۰: تفاوت جایانت پلاکت رتیکولار (جوان) با یک جایانت پلاکت معمولی که هردو باعث افزایش اندکس P-LCR می‌شوند ولی فقط پلاکت رتیکولار مقدار IPF را افزایش می‌دهد.



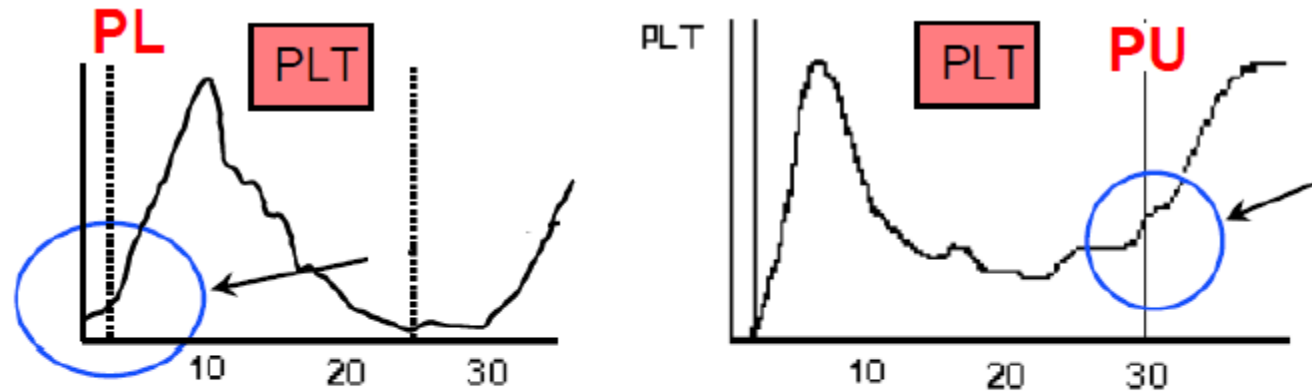
شکل ۳۹-۱۰: هیستوگرام PLT توسط دو ممیز یا کات آف LD و UD به نام‌های PL و PU تفکیک می‌شود که PL در محدوده ۲-۶ fl و PU در محدوده ۱۲-۳۰ fl متغیر بوده و به پلاکت‌های بالای ۱۲ fl که فراوانی بالای ۲۰٪ داشته باشند، P-LCR یا نسبت پلاکت‌های پلاکت گفته می‌شود و محدوده نرمال آن ۱۵-۳۵٪ می‌باشد. از حاصل ضرب P-LCR در شمارش تام پلاکت نیز تعداد مطلق یا اندکس P-LCC حاصل می‌شود. اندکس P-LCR در سندرم ویسکات آلدریچ کاهش و در سندرم برنارد سولیر، بیماری‌های مرتبط با MYH-9 و ترومبوسیتوپنی‌های تخریبی و احتباسی کاهش دارد.

| Morphology Grading Table         |        |        |         |
|----------------------------------|--------|--------|---------|
| Cell Name                        | Few/1+ | Mod/2+ | Many/3+ |
| WBC                              |        |        |         |
| Döhle bodies                     | N/A    | 2–4    | >4      |
| Vacuolation<br>(neutrophil)      | N/A    | 4–8    | >8      |
| Hypogranulation<br>(neutrophil)  | N/A    | 4–8    | >8      |
| Hypergranulation<br>(neutrophil) | N/A    | 4–8    | >8      |
| Platelets                        |        |        |         |
| Giant Platelets                  | N/A    | 11–20  | >20     |

- If P-LCR, MPV and PDW increase together.

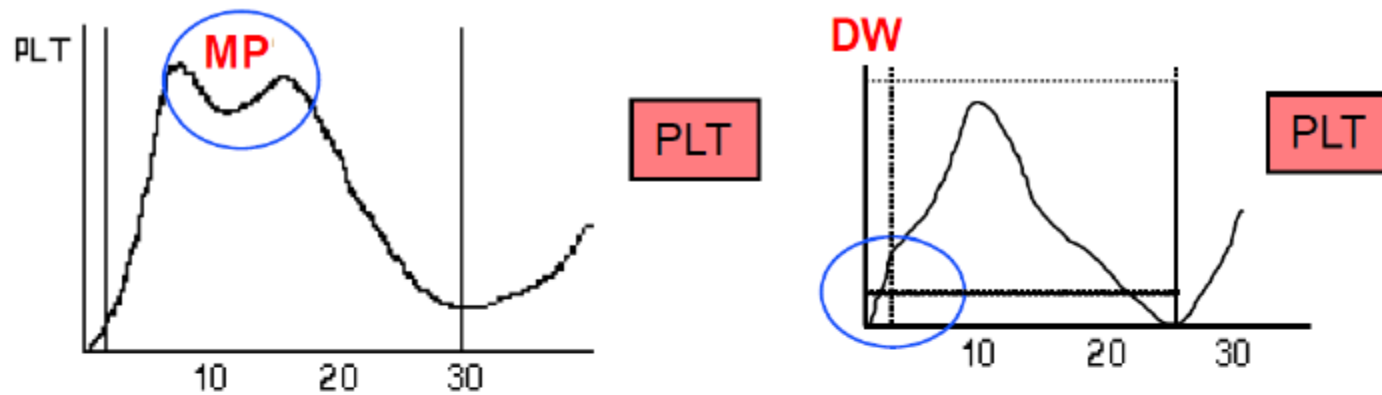


شکل ۴۰-۱: هرچند هر دو گراف به دلیل میل منحنی به سمت راست با حضور جایانت پلاکت همراه هست، ولی در گراف سمت چپ، دم سمت راست هیستوگرام در ارتفاع پایینی ممیز UD/PU را قطع کرده و لذا شمارش آن صحیح می باشد ولی در گراف راست، محل قطع شدن ممیز PU در ارتفاع بالاتری بوده و احتمالاً تعدادی از پلاکت های خیلی بزرگ و رتیکولار وارد محدوده شمارش RBC شدند و حتی احتمال دارد قسمتی از RBC های خیلی کوچک یا شیتوسیت نیز وارد محدوده شمارش پلاکت شده باشند، لذا به دلیل فلاگ PU و DW، نتایج آن به صورت نقطه چین بوده و قطعاً شمارش دستگاه می بایست با PBS تایید و چک شود. در گراف سمت راست، پلاکت ها بزرگ تر و رتیکولارتر از گراف سمت چپ هستند. لازم به ذکر است که پلاکت رتیکولار و رتیکولوسیت هر دو مانند جایانت پلاکت و ماکروسیت بزرگ هستند ولی برخلاف آنها به دلیل داشتن RNA با تiazol یا آکریدین نارنجی فلورسنت هم می شوند و لذا IPF و IRF بالایی هم دارند.



شکل ۴۱-۱: در شرایط نرمال، هیستوگرام پلاکت می بایست مابین ممیزهای PL و PU قرار داشته باشد و از خط پایه بعد PL شروع و قبل از ممیز PU به خط پایه صفر مماس شده و با ممیزهای PL و PU تقاطع نداشته باشند. گاهی محلول های ایزوتون یا بلانک دارای رسوبات نمکی و دبری های زیر ۲ fl هستند که حضور آنها باعث می شود تا هیستوگرام پلاکت قبل از ممیز ۲ فمتولیتتری PL آغاز شود که فلاگ PL ثبت می شود (البته در سندرم ویسکات آلد ریچ با پلاکت های بسیار ریز نقطه ای شکل نیز این فلاگ شایع است). گاهی نیز حضور جایانت پلاکت، کلامپ پلاکتی (ناشی از لخته ریز، عدم تناسب ضد انعقاد، بهم زدن کافی خون بعد از نمونه گیری) و اگر گاسیون ناشی از EDTA باعث می شود تا امتداد هیستوگرام پلاکت قبل از ممیز PU به خط پایه مماس نشده و خط PU را قطع کند که در چنین مواردی فلاگ PU ثبت می شود. مورد مشابه زمانی رخ می دهد که دامنه سمت چپ هیستوگرام RBC نیز در شرایطی مثل شیتوسیتوز (میکروآنژیوپاتیک های مختلف) و میکروسیتوز شدید اریتروسیتی (مثل پیروپونیکلوسیتوز، تالاسمی ماژور و اینترمدیا) خط PU را قطع کرده و فلاگ PU را ایجاد کند.

- Due to schistocytosis, PLT count Corrected from 253000/ul to 76000/ul.
- Schistocytosis can increase MPV, PDW and P-LCR Value Falsely.
- Due to n-RNC presence (135n-RBC/100WBC), WBC count corrected from 185000/ul to 8500/ul.



شکل ۴۲-۱: همانند پدیده دیپورفیسیم در RBC، تزییق اخیر پلاکت نیز باعث دو قله‌ای شدن هیستوگرام پلاکت و ثبت فلاگ MP<sup>۵</sup> می‌شود. ارتفاع قله PLT یا RBC هرچقدر که باشد، معادل ۱۰۰٪ محسوب می‌شود. حال اگر نسبت به قله، ارتفاع ۲۰٪ را در نظر بگیریم، در محل تقاطع خط ۲۰٪ با دو ممیز PL و PU اگر هیستوگرام عریض‌تر از این دو ممیز باشد، فلاگ DW ثبت می‌شود.

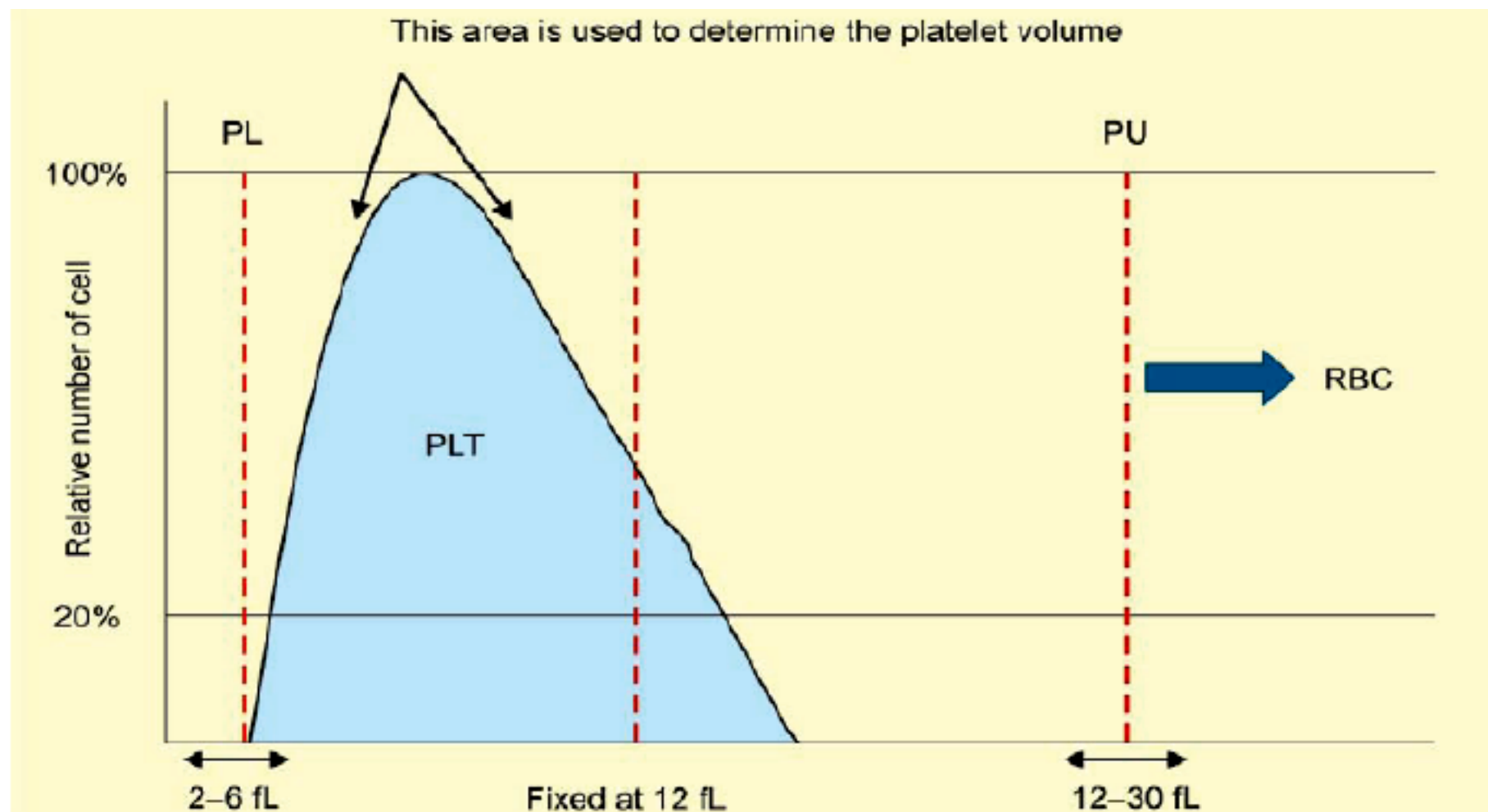
## تفمین پلاکت از روی PBS:

### روش غیرمستقیم فونیو (Fonio's indirect method):

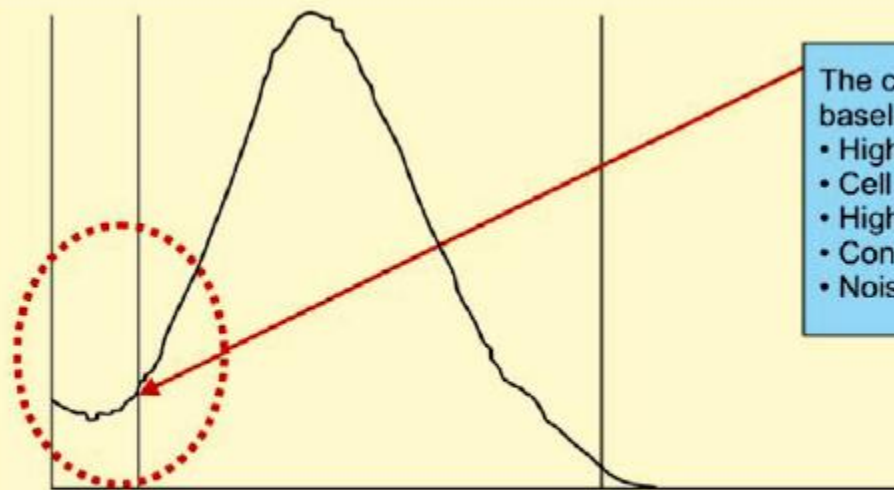
بر اساس مشاهدات میکروسکوپی، به ازاء هر ۱۰۰۰ اریتروسیت، حدود ۱۰۰ پلاکت و ۱/۵ لکوسیت در گستره خون محیطی رنگ‌آمیزی شده وجود دارد. در این روش ۱ حجم از خون بیمار را با ۵ حجم سولفات منیزیم ( $SO_4Mg$ ) ۱۴٪ مخلوط و سپس یک گستره معمولی از آن تهیه و آن را با یکی از رنگ‌های گروه رومانفسکی رنگ‌آمیزی می‌کنند. با بزرگنمایی ۱۰۰۰X ایمرسیون و همانند تست رتیک، به ازاء ۱۰۰۰ گلبول‌های قرمز، تعداد پلاکت‌ها را نیز شمارش نموده و سپس با توجه به نسبت فوق، تعداد پلاکت‌ها را بر اساس شمارش RBC محاسبه می‌نماییم. به عنوان مثال: شمارش گلبول قرمز بیماری  $RBC=4.8 \times 10^6/mm^3$  و شمارش پلاکت وی به ازاء هزار گلبول قرمز، ۱۰۰ پلاکت می‌باشد. در نتیجه تعداد پلاکت وی  $480000 \div 1000 = 480$  خواهد بود.

### تفمین پلاکت از روی گستره فون ممیطی (Direct method):

برای این منظور شمارش پلاکت‌های ده میدان میکروسکوپی با عدسی ۱۰۰ را بدست آورده و میانگین آن را برای خون وریدی EDTA دار به ۱۵۰۰۰ و برای خون مویرگی سرانگشت به ۲۰۰۰۰ ضرب می‌کنیم. میدان‌های انتخاب شده می‌بایست مطابق میدان‌های دیف سلولی، غیرشلوغ بوده و بیش از ۵٪ اریتروسیت-ها، حالت رولو نداشته باشند. در صورت مشاهده اگر گاسیون پلاکتی در گستره رنگ شده، نمونه‌گیری می‌بایست تکرار شود. به عنوان مثال اگر میانگین پلاکت-های ۱۰ میدان ۱۰۰۰X حدود ۱۵ عدد باشد، تخمین پلاکتی وی به شرط استفاده از خون حاوی EDTA حدود  $225000 \div 15 = 15000$  خواهد بود.

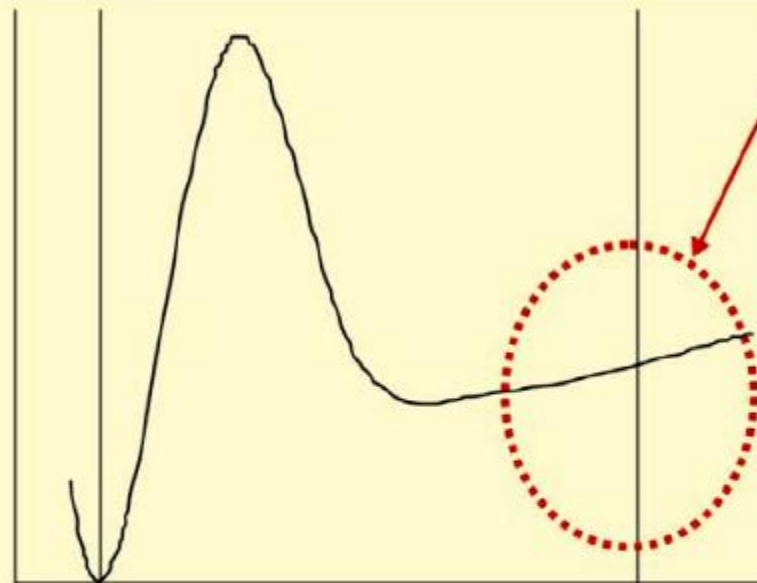


شکل ۴۳-۱۰: هرچند محدوده شمارش پلاکت بین ۲-۲۵ fL هست ولی ممیز PL بین ۲-۶ و ممیز PU بین ۱۲-۳۰ متغیر می باشد. البته پلاکت ها تا سایز ۷۰ fL نیز دیده شده است که وارد محدوده RBC شده و به طور کاذب تحت عنوان RBC شمارش می شوند. لازم به ذکر است که مخمر، باکتری، حباب هوا (ناشی از هواکشیدن پمپ یا شلنگ)، گامت مالاریا و شیسیتوسیت نیز به اشتباه پلاکت شمارش می شوند.



The curve does not start at the baseline possible cause:

- High blank value
- Cell fragments
- High number of bacteria
- Contaminated reagents
- Noise

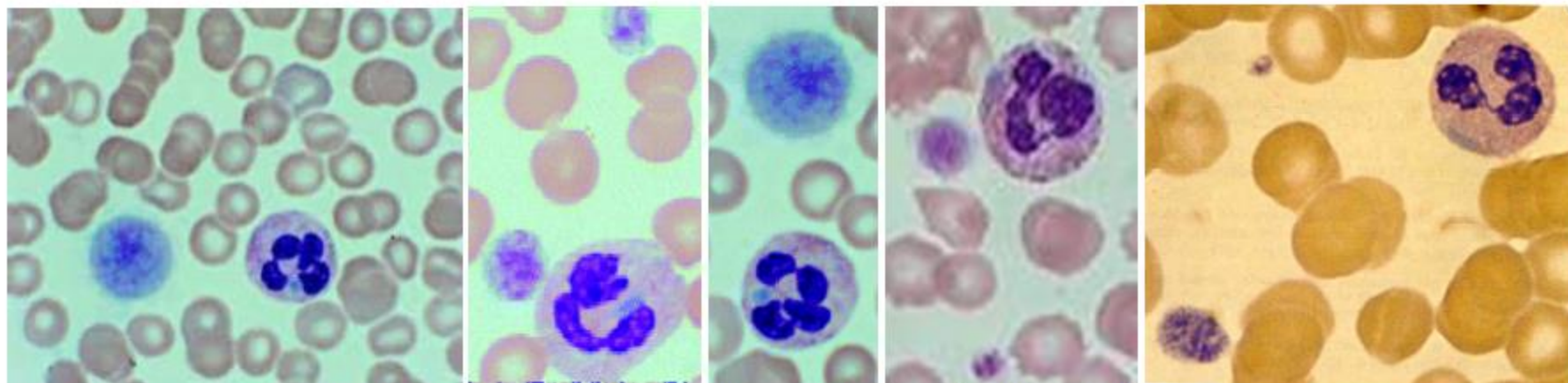


#### Possible causes

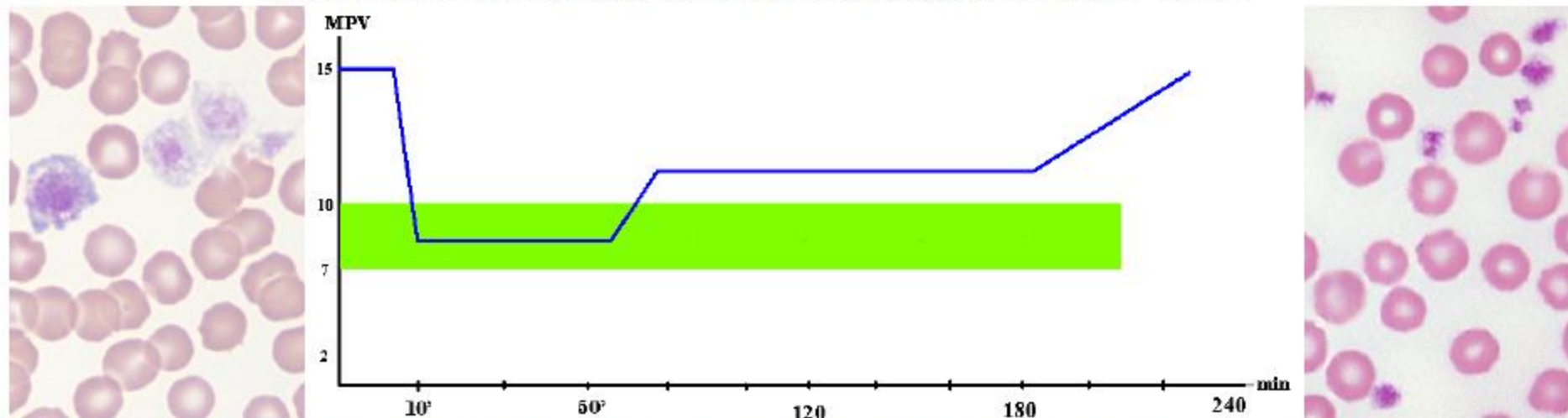
The curve does not end at the base line. Possible causes:

- Platelet clumps
- EDTA incompatibility
- Clotted sample
- Giant platelets
- Microerythrocytes
- Fragmented or dysplastic RBC's as in hemolytic anemia

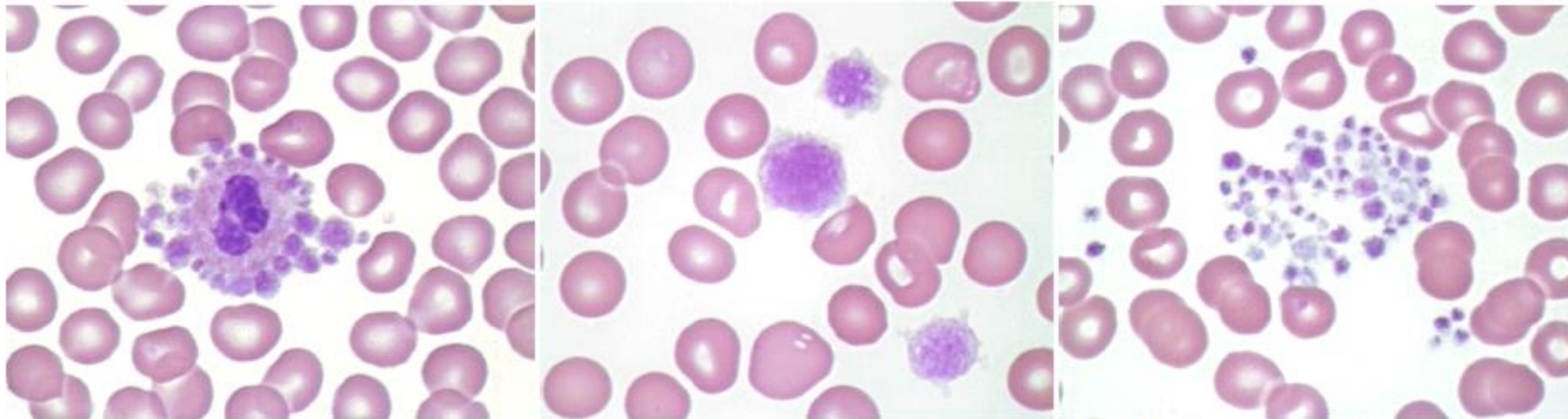
شکل ۴-۱۰: هرگاه سمت چپ یا راست هیستوگرام پلاکت به خط پایه نرسد و ممیز PL را در ارتفاع ۱۰٪ و ممیز PU/RL را در ارتفاع ۴۰٪ قطع کند، اندکس‌های پلاکتی اعتبار خود را از دست داده و مقابل آنها فلاگ درج می‌شود.



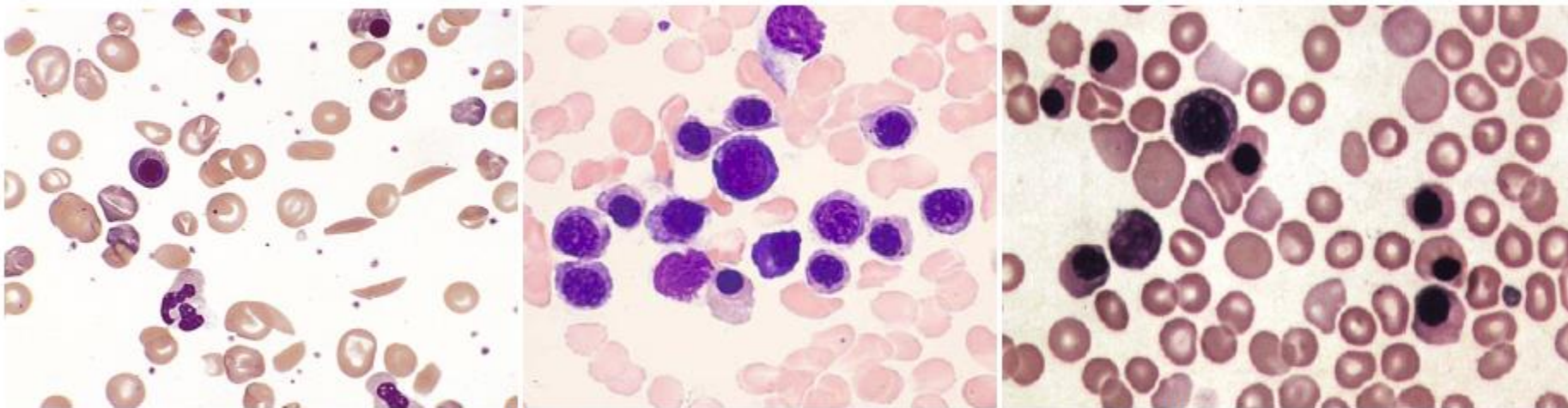
شکل ۱۳۱-۱۰: آنومالی می‌هگلین توأم با جایانت پلاکت‌های غول‌پیکر و آنکلوژیون‌های شبه دوهل در سیتوپلاسم نوتروفیل‌ها



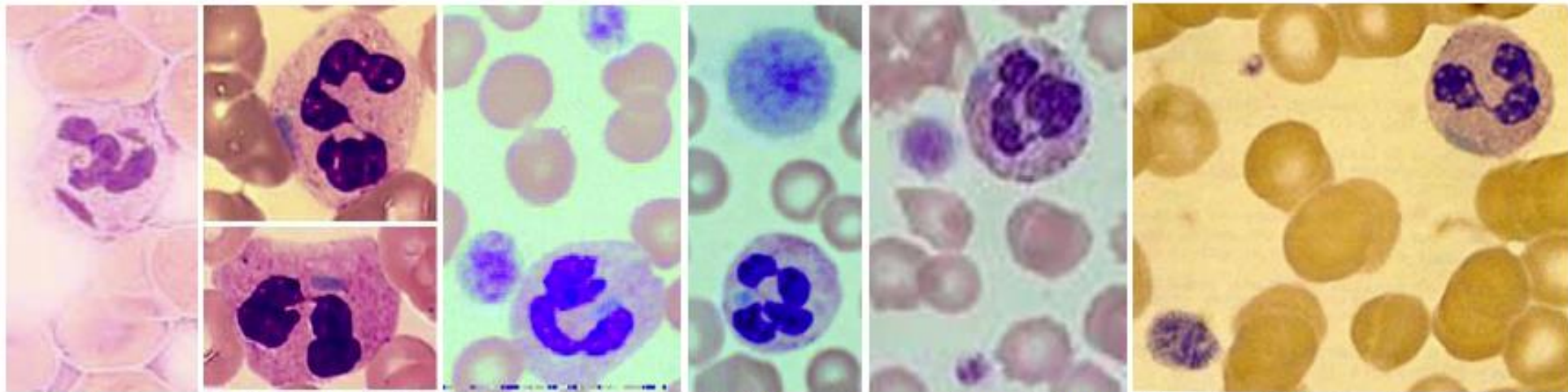
شکل ۱۳۲-۱۰: سائیز پلاکت‌ها در ساعات مختلف تهیه گستره خون محیطی تفاوت دارد، هنگام تهیه گستره خون محیطی و در عرض ۱۰ دقیقه ابتدایی، جایانت پلاکت‌ها رقمی حدود ۸۰٪ پلاکت‌ها را تشکیل می‌دهند که کاذب بوده و به دلیل شرایط خون‌گیری، استرس فیزیکی، به هم زدن مکانیکی و میکس شدن پلاکت‌ها ایجاد می‌شوند. طی ۶۰-۱۰ دقیقه میانی، جایانت پلاکت‌ها به ۵٪ (حداقل مقدار) کاهش یافته و بعد از ۶۰ دقیقه مجدداً سائیز عمده پلاکت‌ها تا بیش از ۳ میکرون افزایش می‌یابد، لذا بهترین زمان برای بررسی اورژانسی و سریع مورفولوژی پلاکت‌ها، ۶۰-۱۰ دقیقه بعد از خون‌گیری می‌باشد. از طرفی دیگر، بعد افزایش MPV طی یک ساعت بعد از خون‌گیری، میزان آن مجدداً بین ۳-۱ ساعت پایدار باقی مانده و دوباره با گذشت زمان MPV پلاکت‌ها افزایش بیشتری می‌یابد. از این رو بهترین زمان برای بررسی غیراورژانسی مورفولوژی پلاکت‌ها، ۳-۱ ساعت بعد از خون‌گیری می‌باشد. تغییر شکل پلاکت‌ها از حالت دیسکوئید به شکل کروی، مسئول افزایش در حجم ظاهری پلاکت‌ها در خون EDTA می‌باشد (در مقایسه با خون سیتراته یا بدون ضد انعقاد). برای کسب نتایج قابل تکرار MPV، PCT و PDW، نتایج آزمایشگاهی آنها را می‌بایست با دستگاه‌های چند کاناله و طی ۳-۱ ساعت پس از خون‌گیری تهیه نمود.



شکل ۱۱۹-۱۰: تصویر PBS از میکرواگرگاسیون. جایانت پلاکت (هم اندازه لنفوسیت) و پلاکت اقماری (ستلایتسم) که همگی باعث ترومبوسیتوپنی کاذب می‌شوند ولی ستلایتسم برخلاف دو مورد اول باعث لکوسیتوز کاذب نمی‌شود.



شکل ۱۲۰-۱۰: افزایش شدید N-RBC در خون که باعث لکوسیتوز شدید (به ویژه لنفوسیتوز کاذب)، کاهش کاذب MPXI و LI، افزایش MCV و فلاگ WL می‌شود.



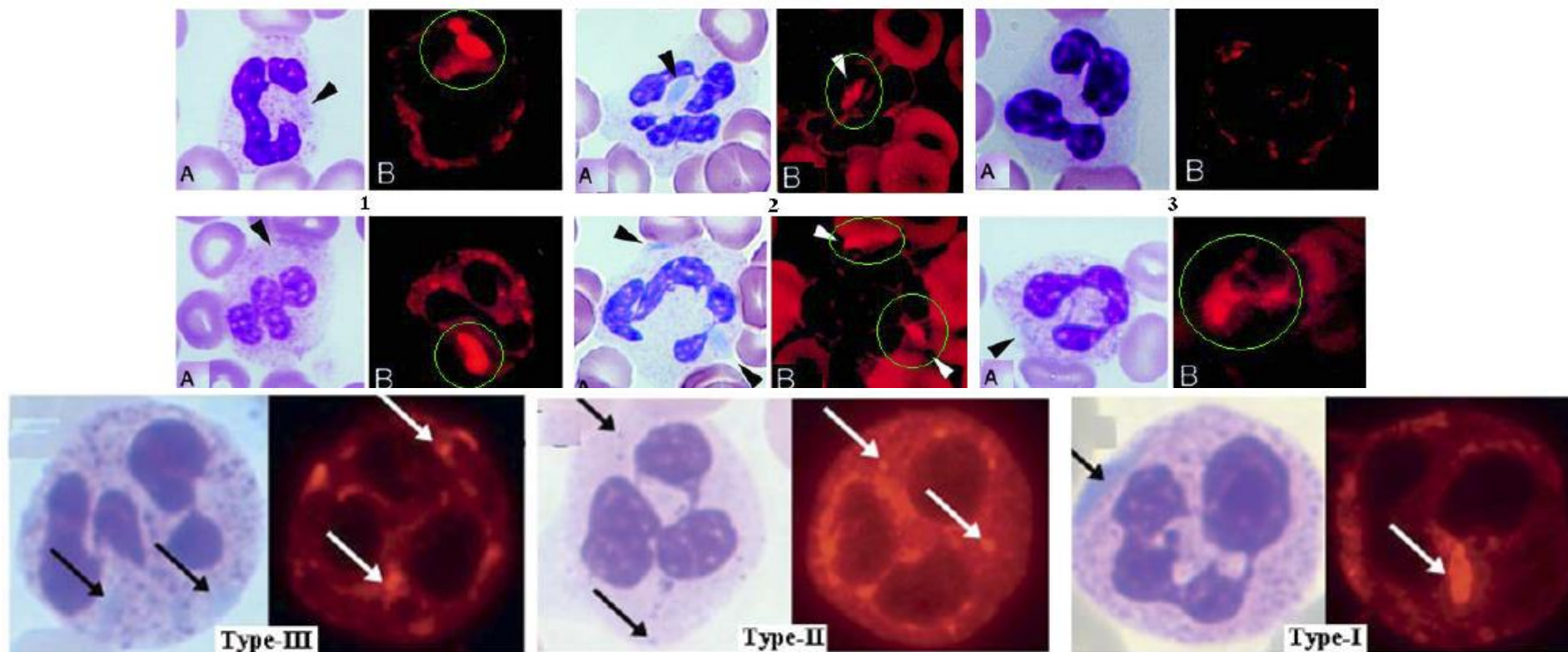
شکل ۲۴: آنومالی می-هگلین توأم با جایانت پلاکت و انکلوژیون‌های شبه دوهل در سیتوپلاسم نوتروفیل‌ها که تصویر سمت چپ، رنگ آمیزی اختصاصی آن با متیل-گرین پیرونین را نشان می‌دهد

جدول ۶: اختلافات بالینی در سندرم‌های ۴ گانه SBS, MHA, FTNS و EAS

| SBS | MHA | FTNS | EAS |                                   |
|-----|-----|------|-----|-----------------------------------|
| +   | +   | +    | +   | ماکروترومبوسیتوپنی (جایانت پلاکت) |
| +   | +   | +    | -   | انکلوژیون‌های شبه دوهل            |
| -   | -   | +    | +   | اختلال شنوایی                     |
| -   | -   | +    | +   | نفريت                             |
| -   | -   | +    | -   | کاتاراکت                          |

جدول ۷: اختلافات بالینی در سندرم‌های ۴ گانه EPS, APSM, MPSD و DFNA17

| DFN17 | MPSD | APSM | EPS |                                   |
|-------|------|------|-----|-----------------------------------|
| +     | +    | +    | +   | ماکروترومبوسیتوپنی (جایانت پلاکت) |
| +     | +    | +    | +   | ریزش مو (عصبی)                    |
| -     | -    | -    | -   | انکلوژیون‌های شبه دوهل            |
| -     | -    | +    | +   | اختلال شنوایی                     |
| -     | -    | +    | +   | نفريت                             |
| -     | -    | +    | -   | زخم‌های چشمی                      |

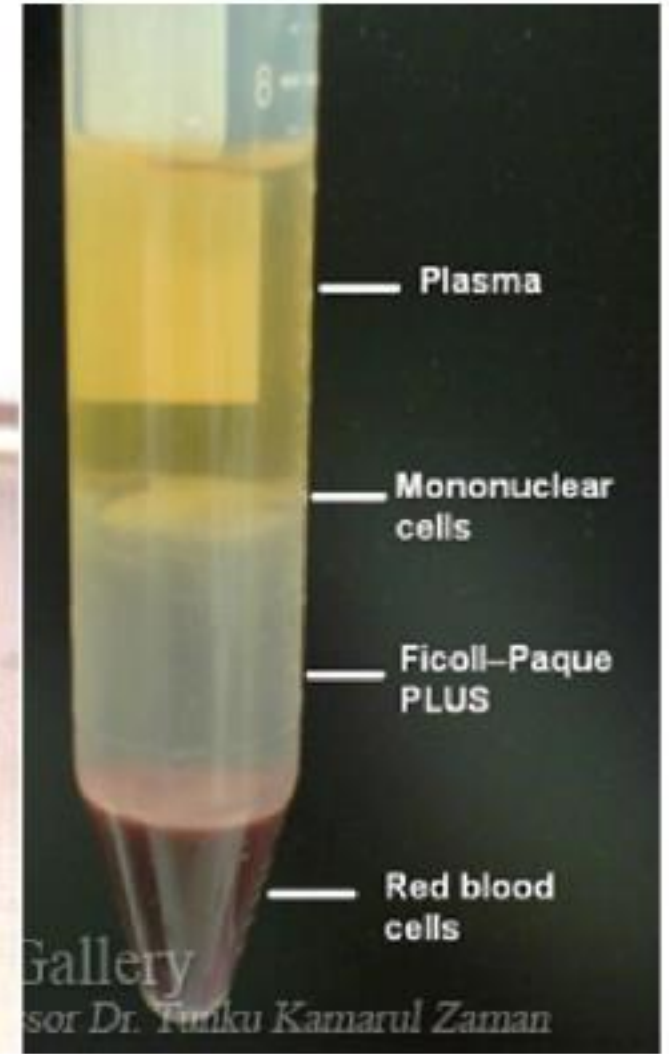
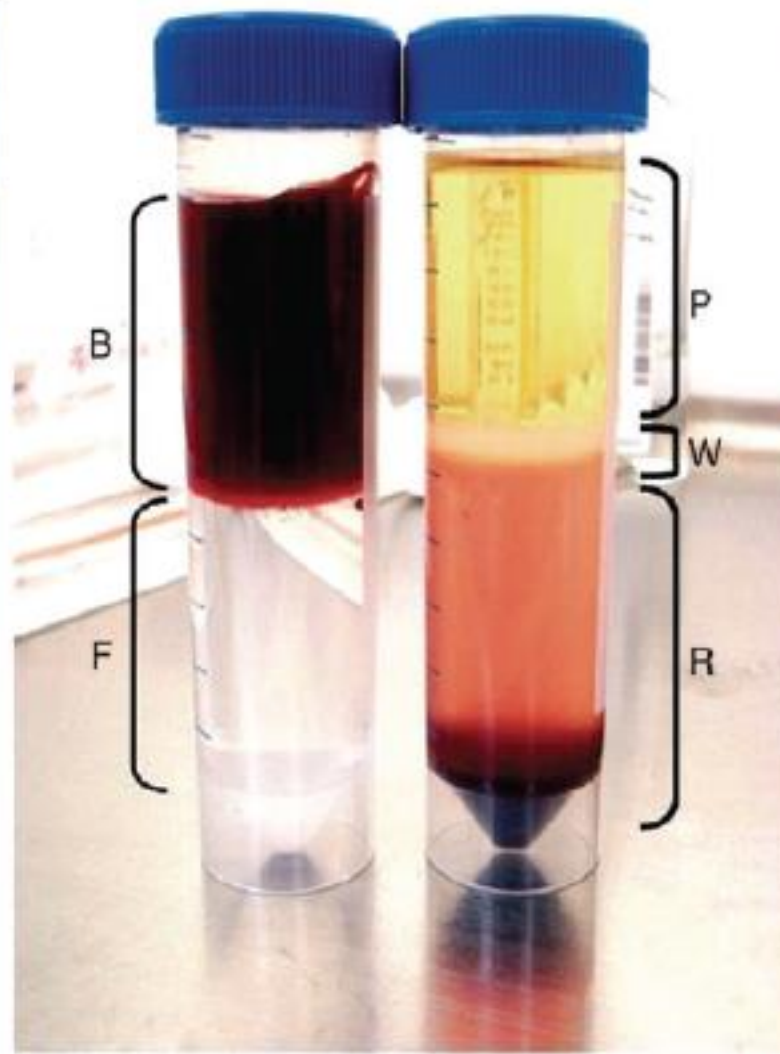


شکل ۳۰: تفاوت سه نوع انکلوژیون I، II، III ناشی از جهش در آگرون ۱، ۳۰ و ۳۸ (به ترتیب) ژن MYH9

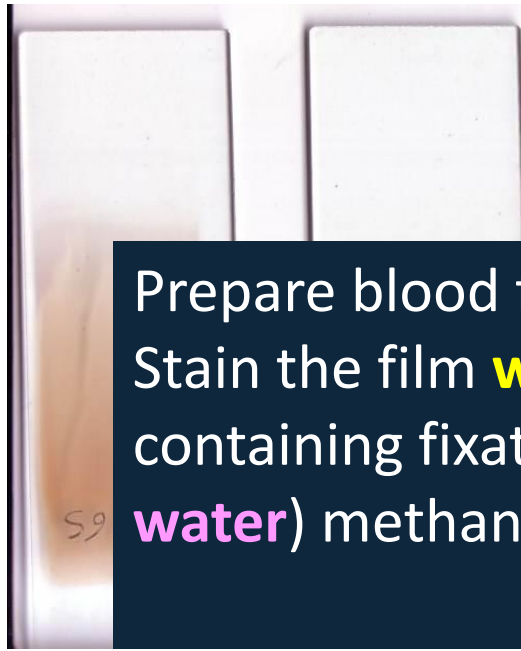
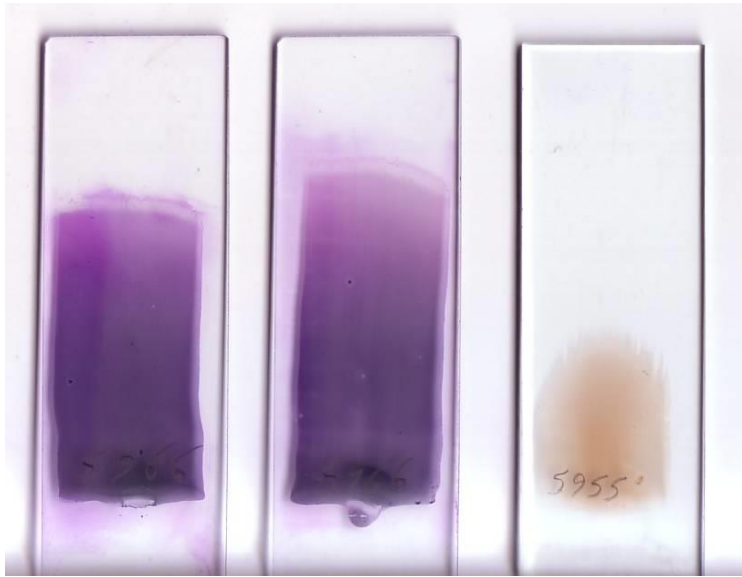
جدول ۸: دسته بندی انواع مختلف انکلوژین های شبه دوهل در سندرم های مرتبط با MYH9

|          | NMMHCA-positive granules |              |                 |
|----------|--------------------------|--------------|-----------------|
|          | Number                   | Shape        | Size ( $\mu$ m) |
| Type I   | 1 or 2                   | Oval-spindle | 0.5-2.0         |
| Type II  | 3-20                     | Circle-oval  | <1              |
| Type III | >20                      | Circle       | <0.5            |

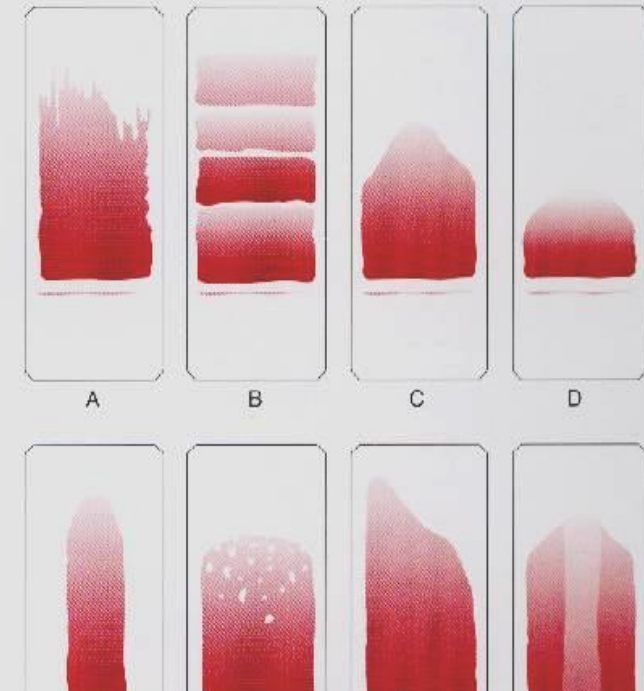
# PBS Preparation



شکل ۷-۱: لایه‌های مختلف سلولی تشکیل شده در مراحل جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون با استفاده از روش فایکول



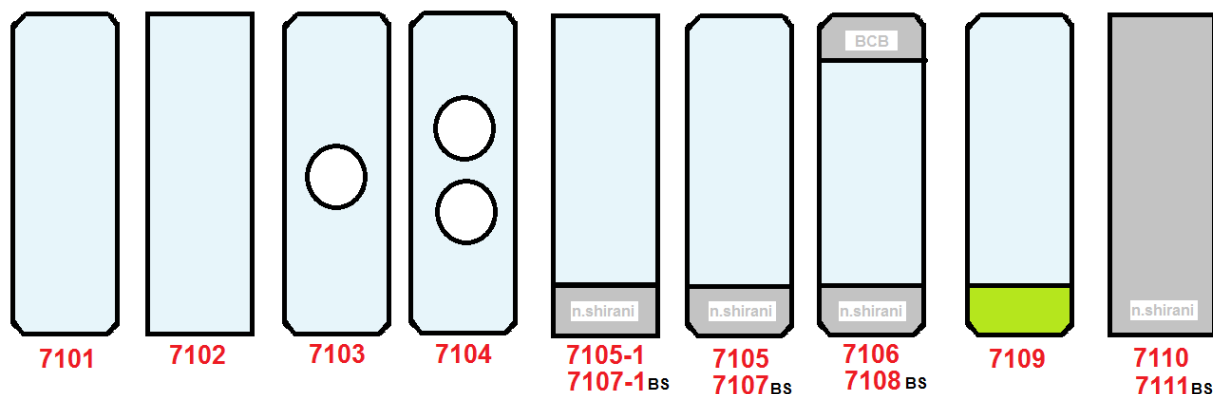
**Figure 1-2** Well-made peripheral blood smear.  
(From Rodak BF: Diagnostic Hematology.  
Philadelphia, WB Saunders, 1995.)



Prepare blood films within **4(3) h** of the blood collection in K EDTA. Stain the film **within one hour of preparation** with a Romanowsky stain, containing fixatives; or **fix within one hour with "water-free"** (i.e., **<3% water**) methanol for later staining.

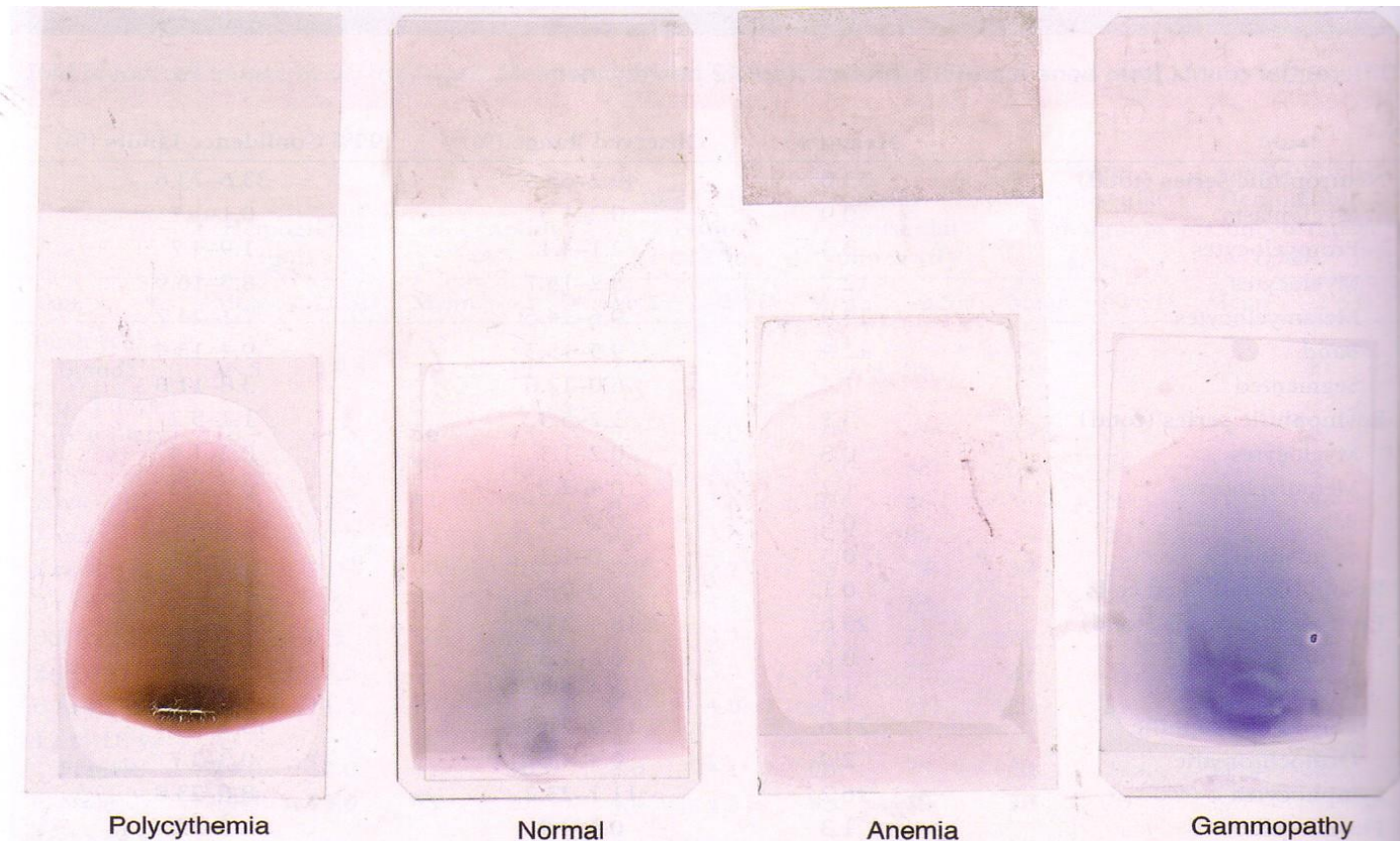
## Spreader of PBS preparation



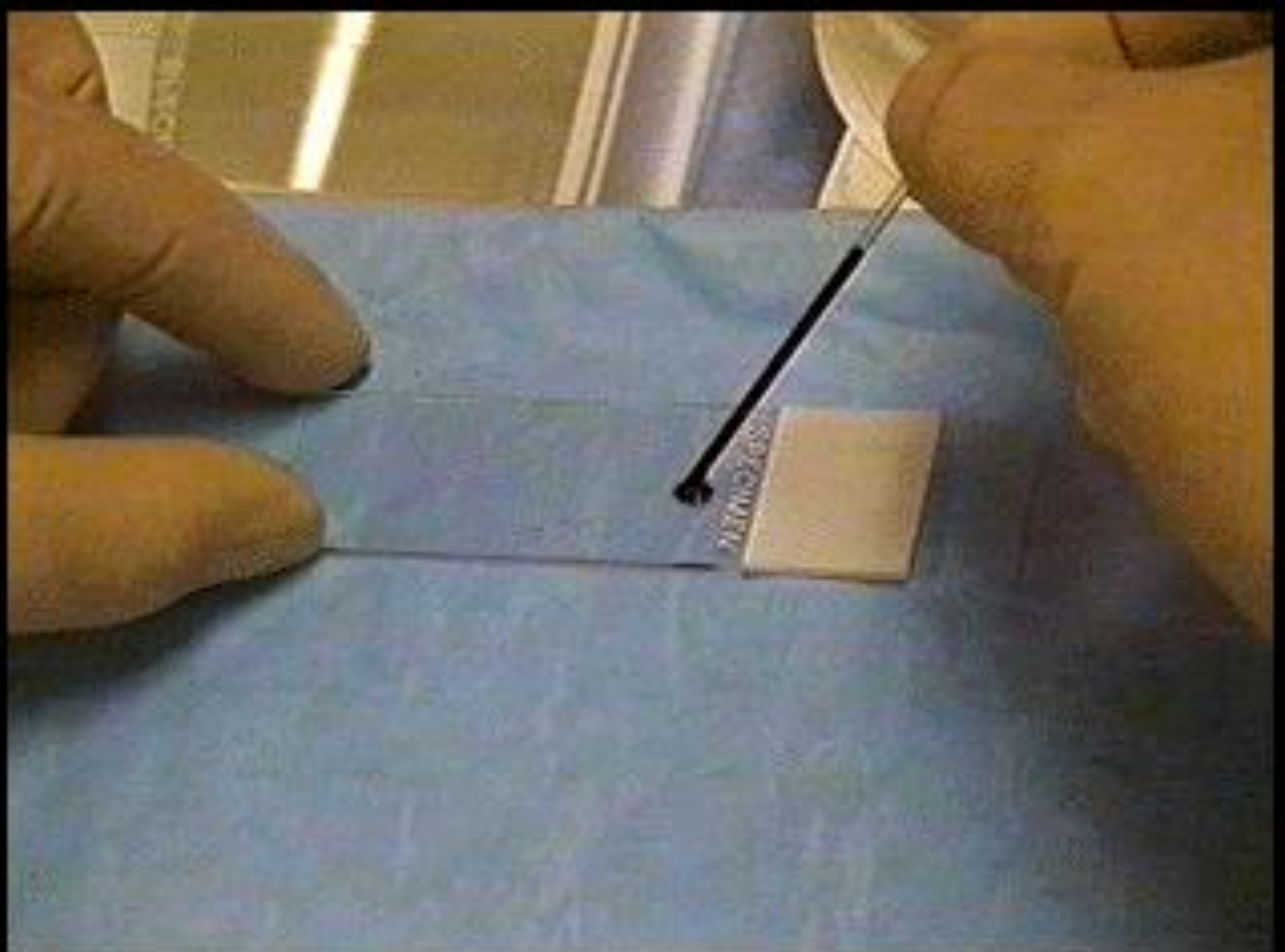


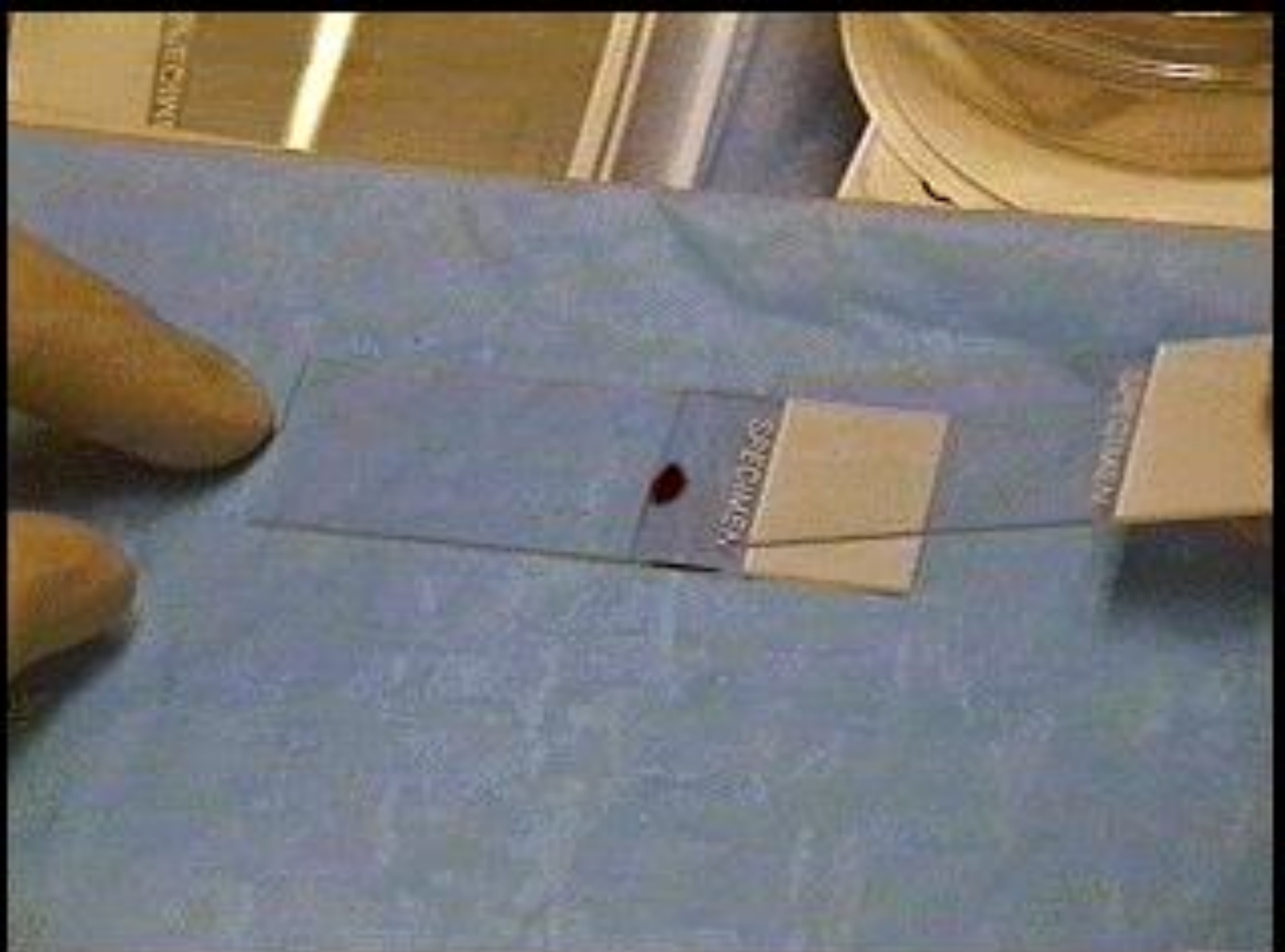
| عبارت<br>انگلیسی | Plain<br>Vs<br>Fosted (Sand blast)<br>One side vs Both side | Colorless<br>Vs<br>coloured | 90° edge Corner<br>vs<br>45° clipped/cutted<br>corner | Un-ground<br>vs<br>Ground/beveled/<br>angled (Rode) | Smooth<br>Vs<br>Concaved |
|------------------|-------------------------------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|--------------------------|
| عبارت<br>فارسی   | صاف یا مات (یک یا دوسر)<br>ماتی روی یک یا هر دو سطح لام     | بی رنگ یا<br>رنگی           | گوشه گونیا (۹۰ درجه یا<br>Pointy) یا اوریب (۴۵ درجه)  | پهلوی تیز یا پرداخت<br>شده و سنگ خورده              | بدون چاهک<br>یا چاهک دار |
| 7101             | صاف و صیقل در هر دو سطح لام                                 | بی رنگ                      | ۴۵ درجه                                               | روده و سنگ ساب                                      | بدون چاهک                |
| 7102             | صاف و صیقل در هر دو سطح لام                                 | بی رنگ                      | ۹۰ درجه                                               | غیر روده و شارپ                                     | بدون چاهک                |
| 7103             | صاف و صیقل در هر دو سطح لام                                 | بی رنگ                      | ۴۵ درجه                                               | روده و سنگ ساب                                      | یک چاهک                  |
| 7104             | صاف و صیقل در هر دو سطح لام                                 | بی رنگ                      | ۴۵ درجه                                               | روده و سنگ ساب                                      | دو چاهک                  |
| 7105             | یک سر مات و روی یک سطح                                      | بی رنگ                      | ۴۵ درجه                                               | روده و سنگ ساب                                      | بدون چاهک                |
| 7105-1           | یک سر مات و روی یک سطح                                      | بی رنگ                      | ۹۰ درجه                                               | غیر روده و شارپ                                     | بدون چاهک                |
| 7106             | دو سر مات و روی یک سطح                                      | بی رنگ                      | ۴۵ درجه                                               | روده و سنگ ساب                                      | بدون چاهک                |
| 7107             | یک سر مات و روی هر دو سطح                                   | بی رنگ                      | ۴۵ درجه                                               | روده و سنگ ساب                                      | بدون چاهک                |
| 7107-1           | یک سر مات و روی هر دو سطح                                   | بی رنگ                      | ۹۰ درجه                                               | غیر روده و شارپ                                     | بدون چاهک                |
| 7108             | HQ، دو سر مات و روی هر دو سطح                               | بی رنگ                      | ۴۵ درجه                                               | روده و سنگ ساب                                      | بدون چاهک                |
| 7109             | HQ، یک سر مات و روی یک سطح                                  | رنگی                        | ۴۵ درجه                                               | روده                                                | بدون چاهک                |
| 7110             | تمام مات روی یک سطح                                         | بی رنگ                      | ۹۰ درجه                                               | غیر روده و شارپ                                     | بدون چاهک                |
| 7111             | تمام مات روی هر دو سطح                                      | بی رنگ                      | ۹۰ درجه                                               | غیر روده و شارپ                                     | بدون چاهک                |
| 7115             | یک سر مات چسبنده و حاوی پلی<br>ال-لایزین شارژ + در یک سطح   | رنگی و بی رنگ               | ۴۵ درجه                                               | روده و سنگ ساب                                      | بدون چاهک                |

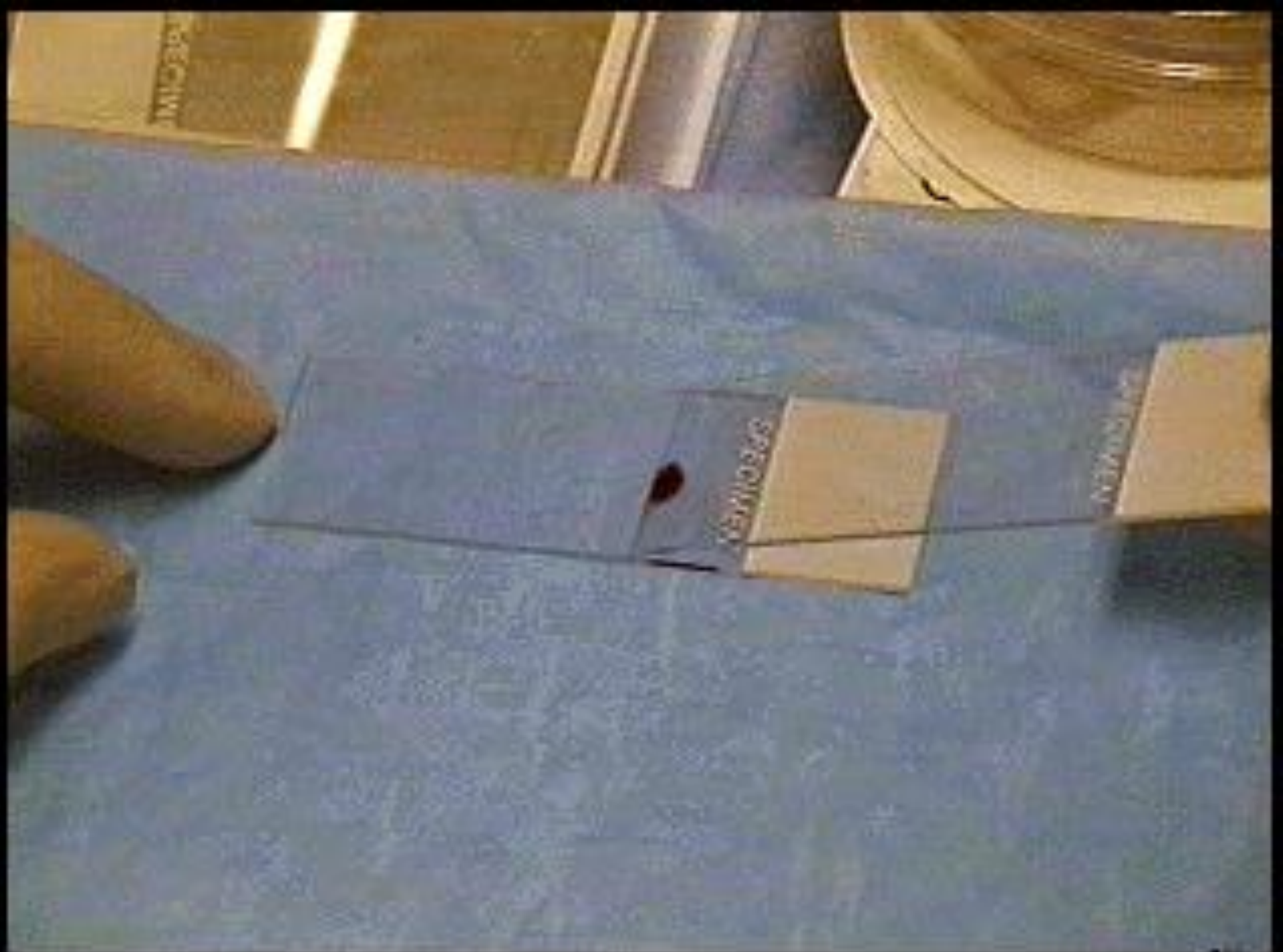
# Peripheral Blood Smear

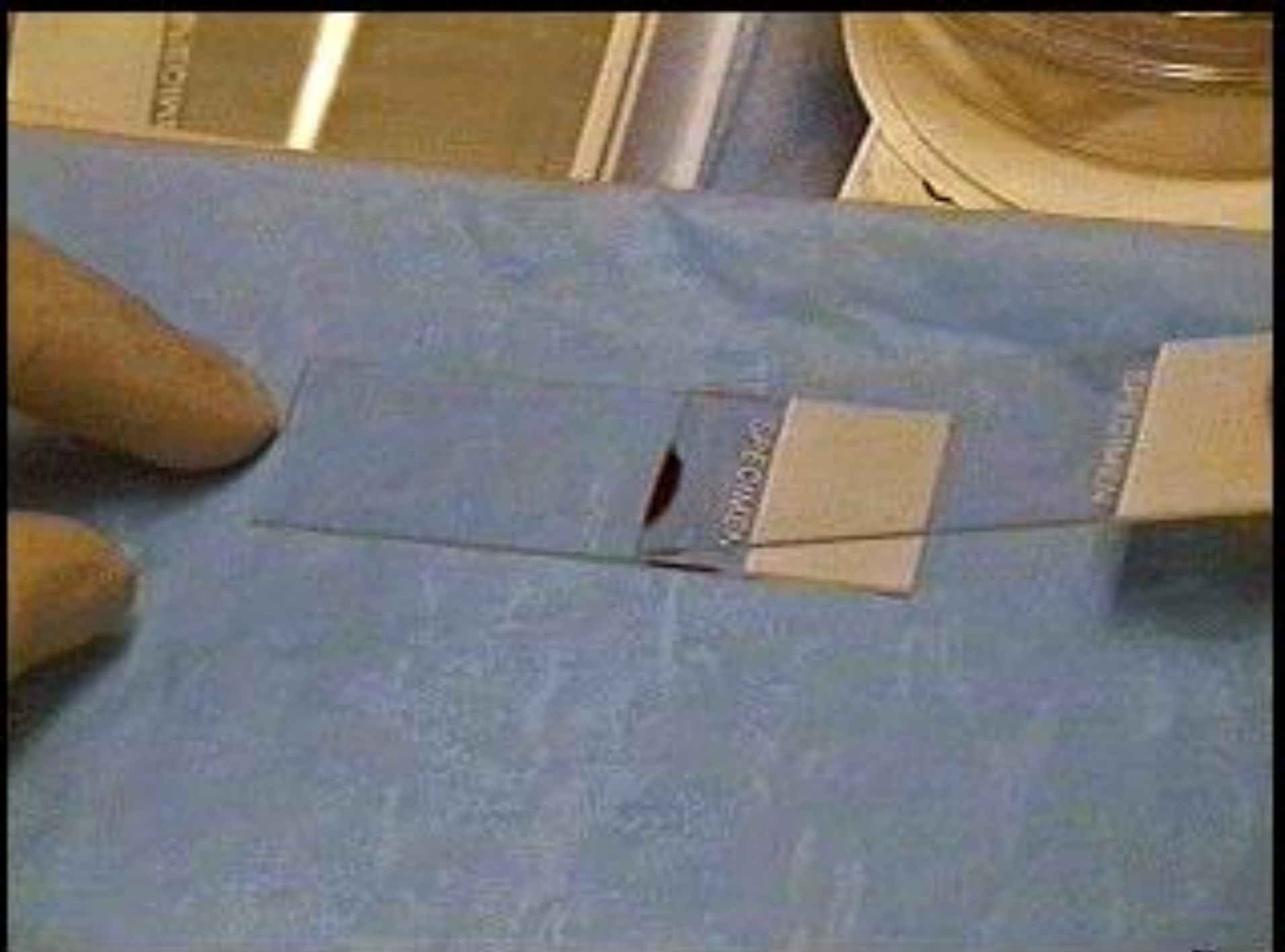


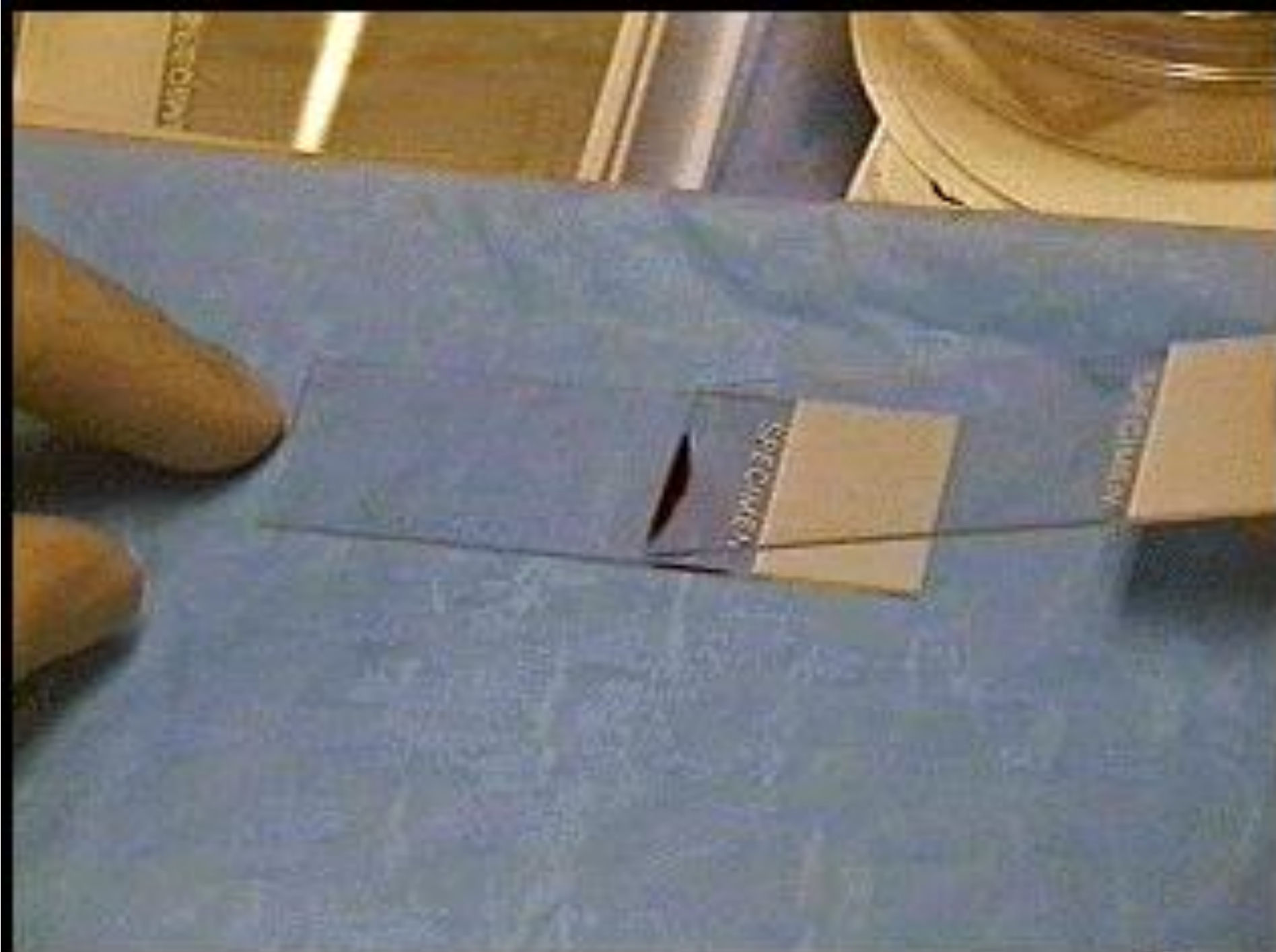
**Figure 8.1.** Macroscopic appearance of blood films. The color of blood smears can reflect severe underlying abnormalities in hematocrit and the presence of abnormal circulating immunoglobins. The smear on the left, from a patient with polycythemia vera and a hemoglobin of 20 g/dL, appears noticeably darker than the normal (hemoglobin = 14 g/dL) and pale anemic sample (hemoglobin = 7). The blood film on the right, from a case of myeloma, is blue because circulating monoclonal immunoglobins take up the basophilic stains used in blood smears.

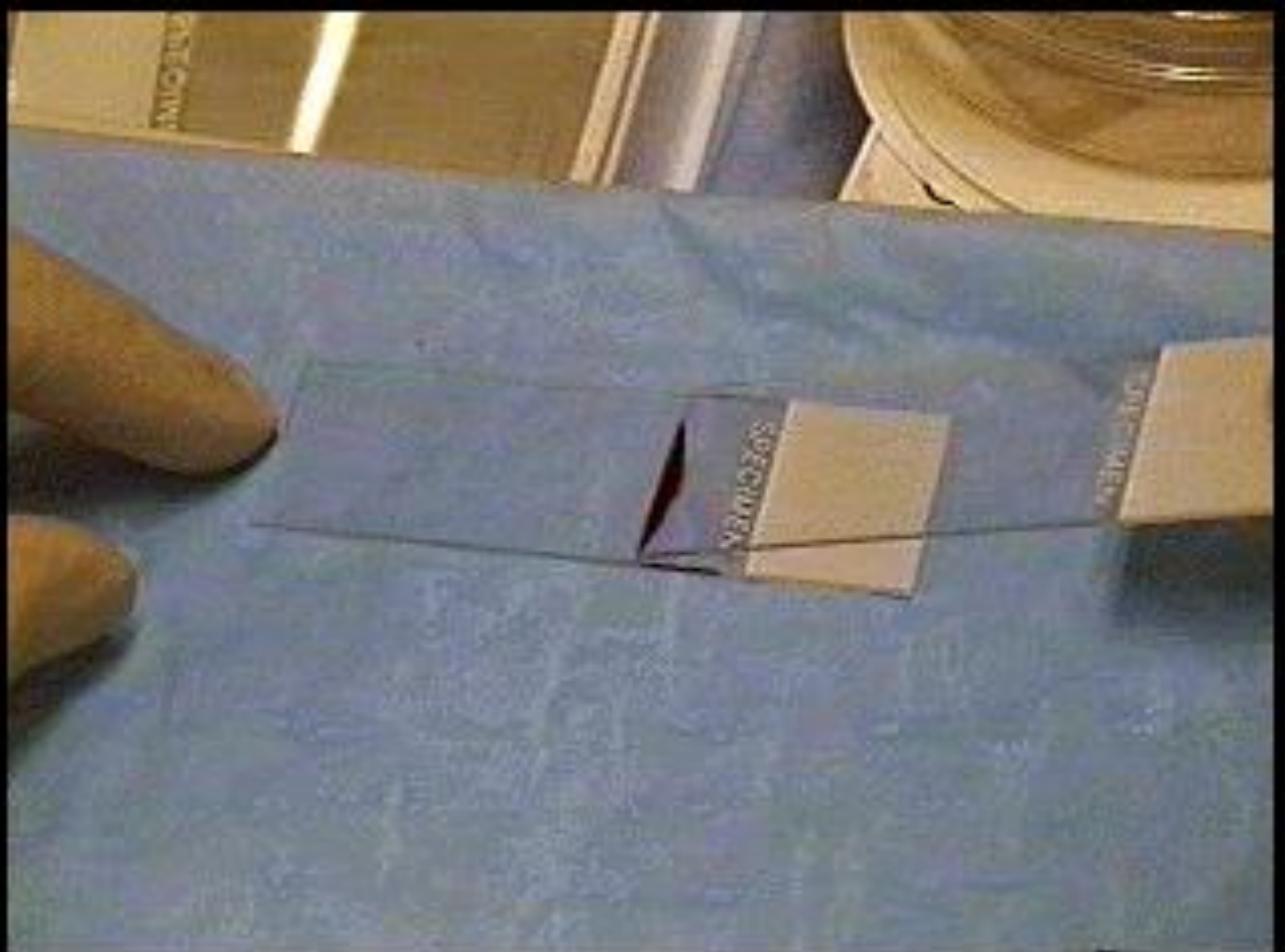


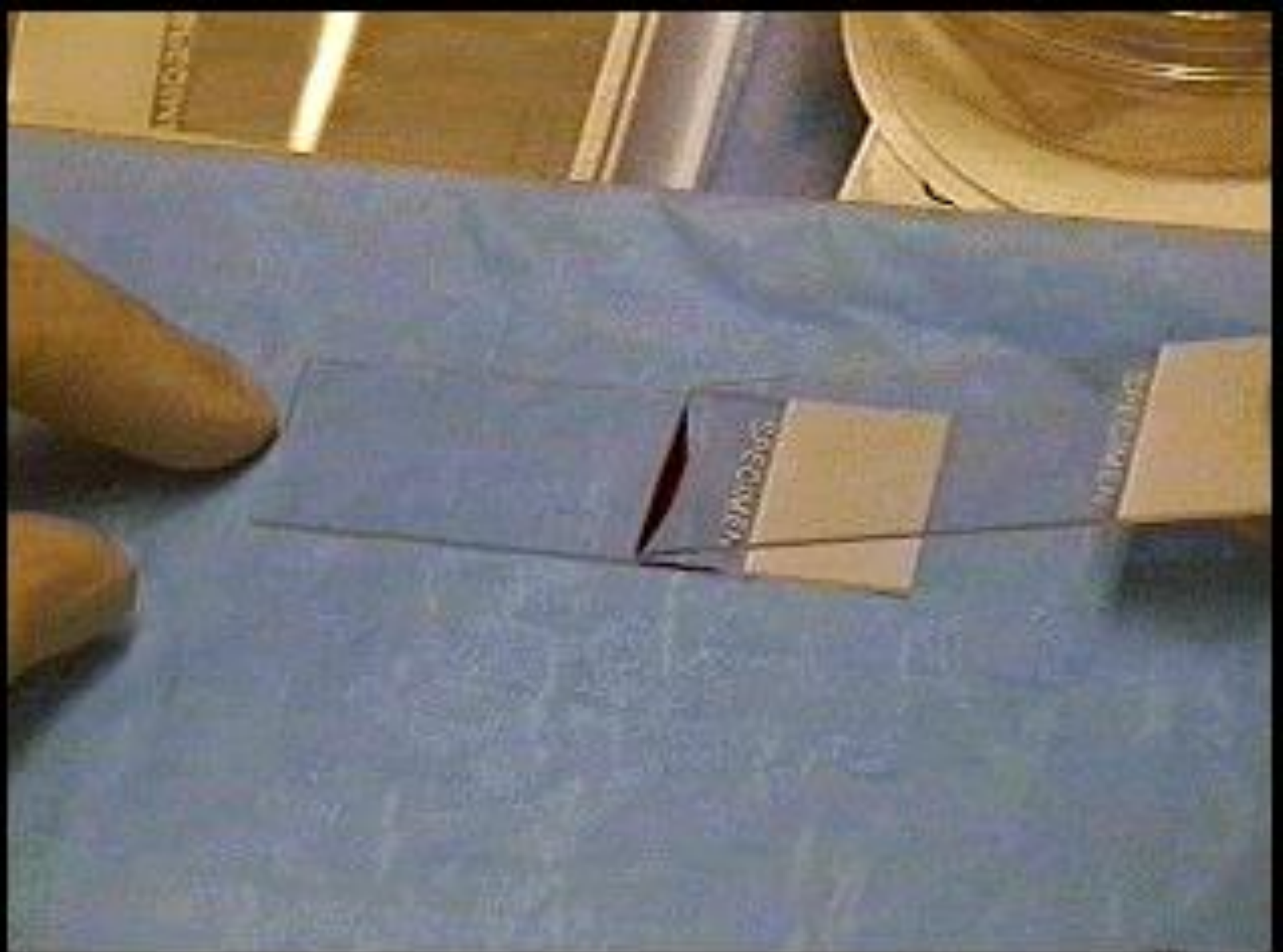


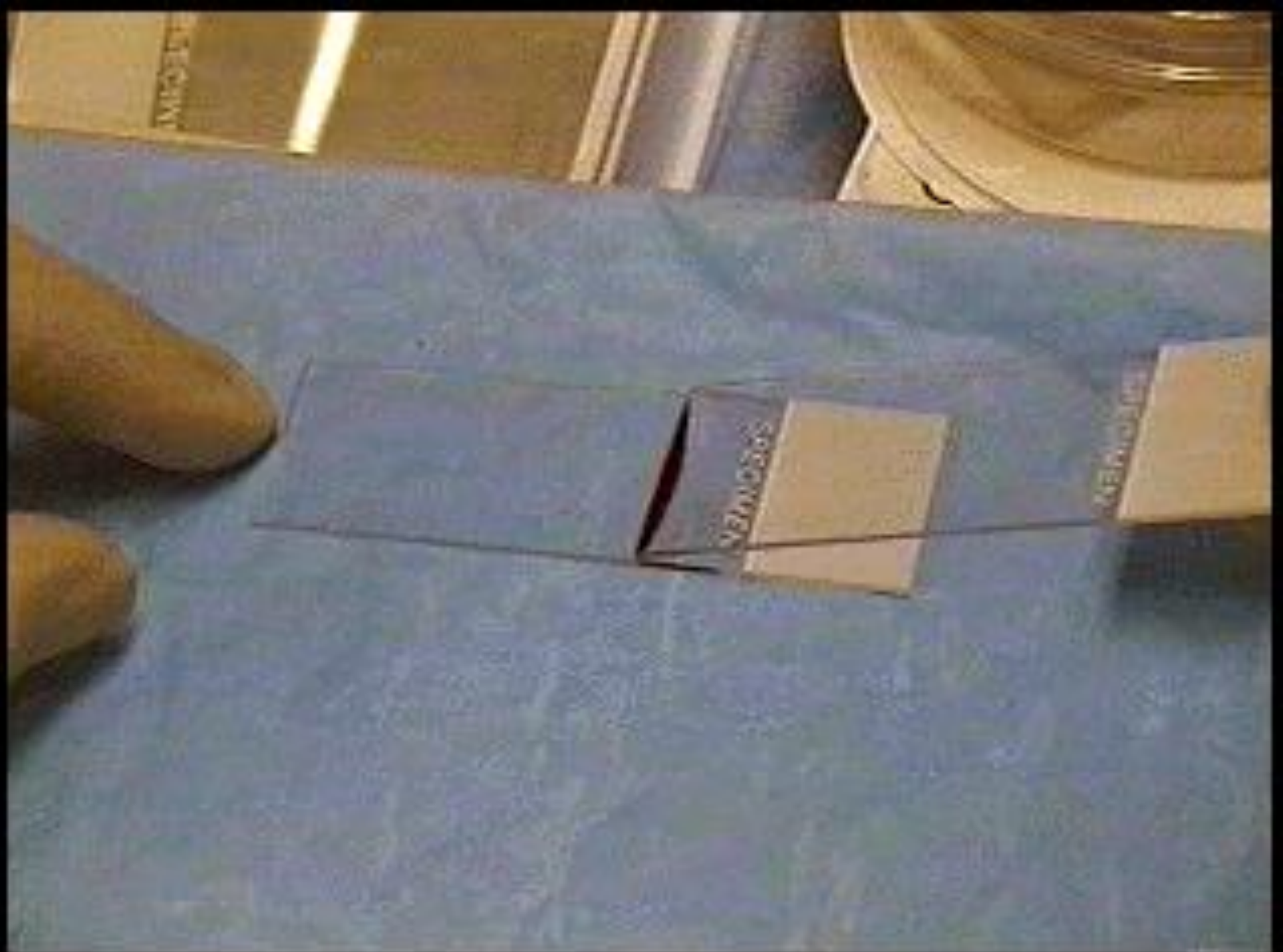


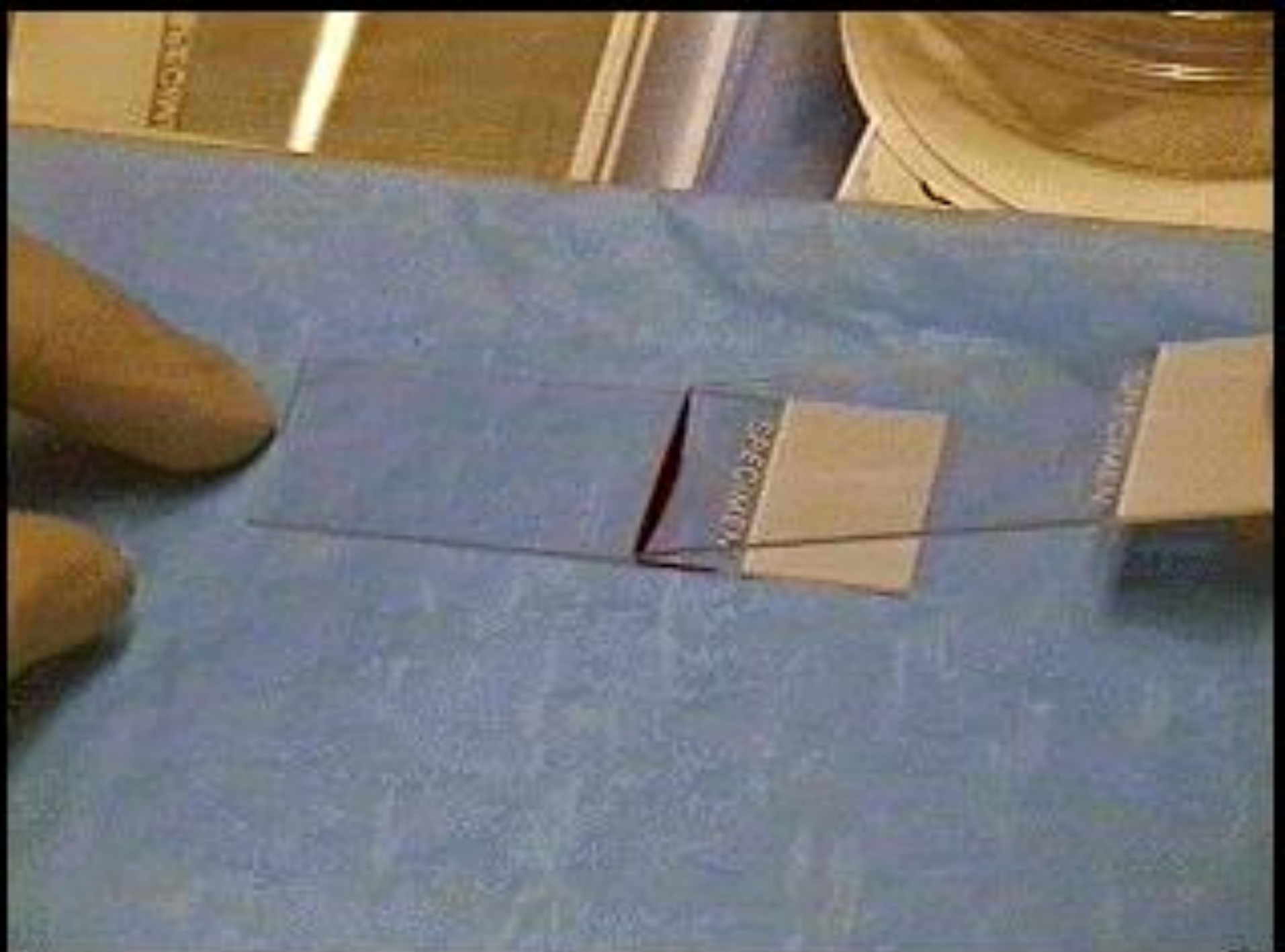


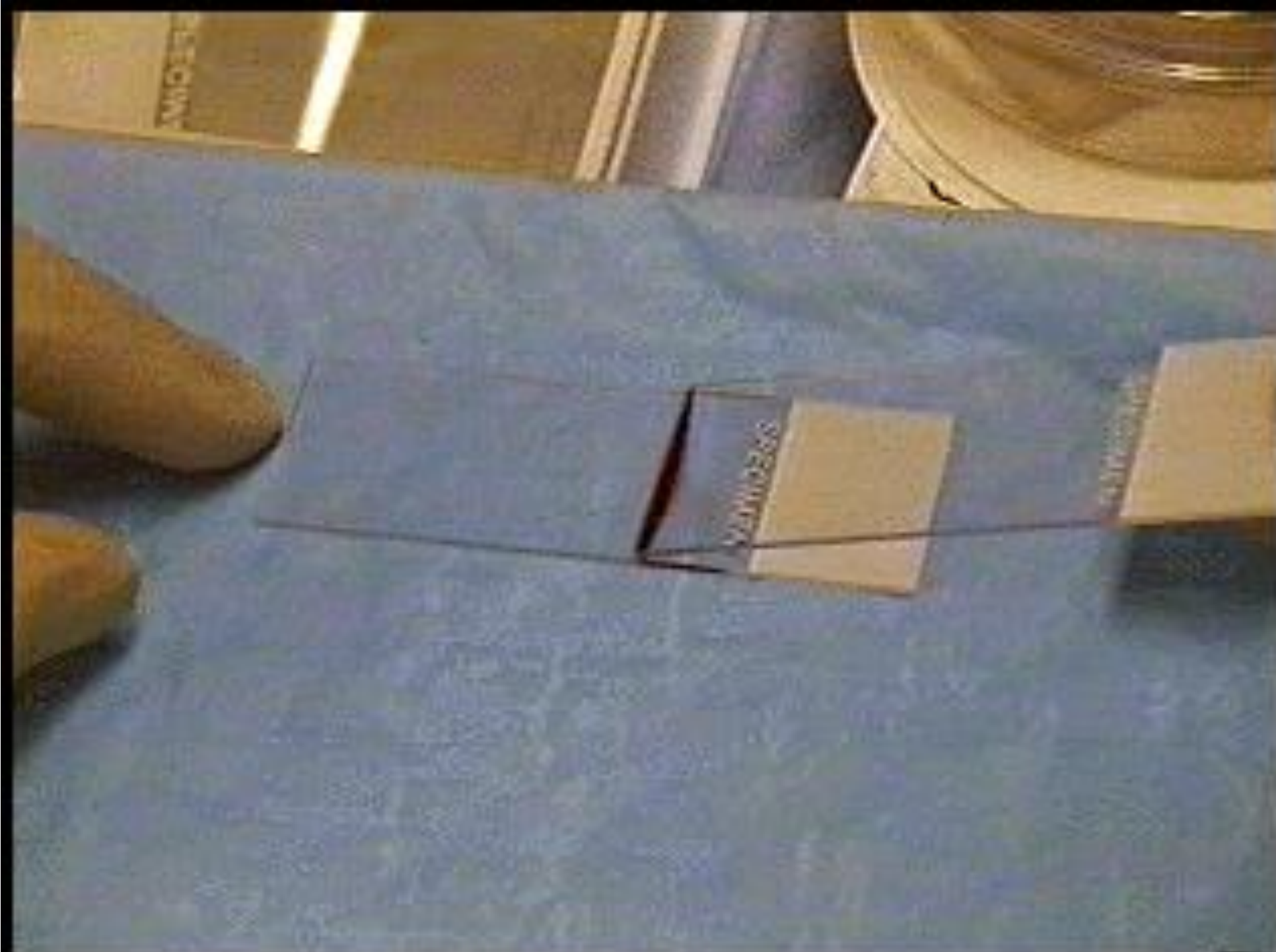


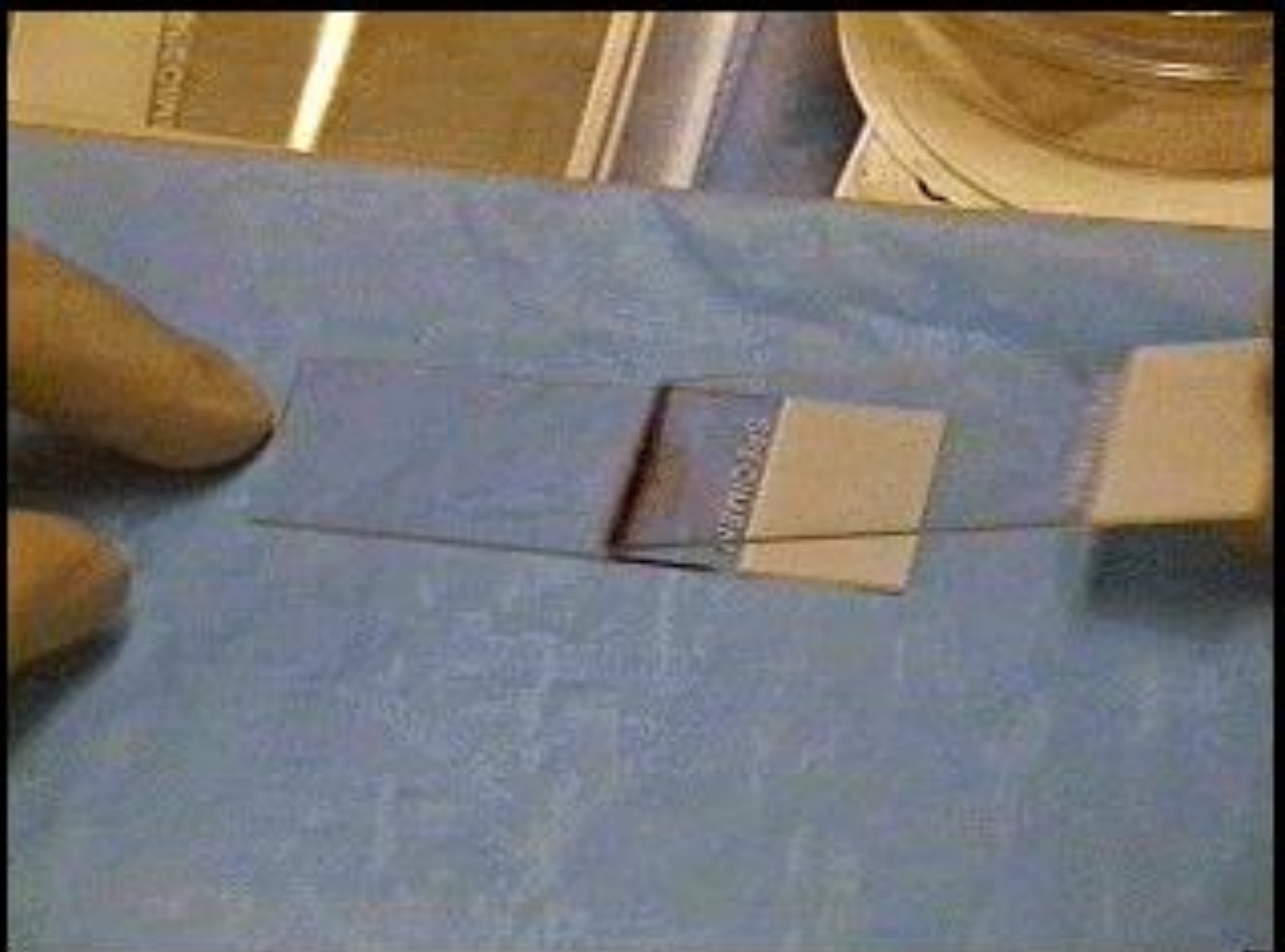


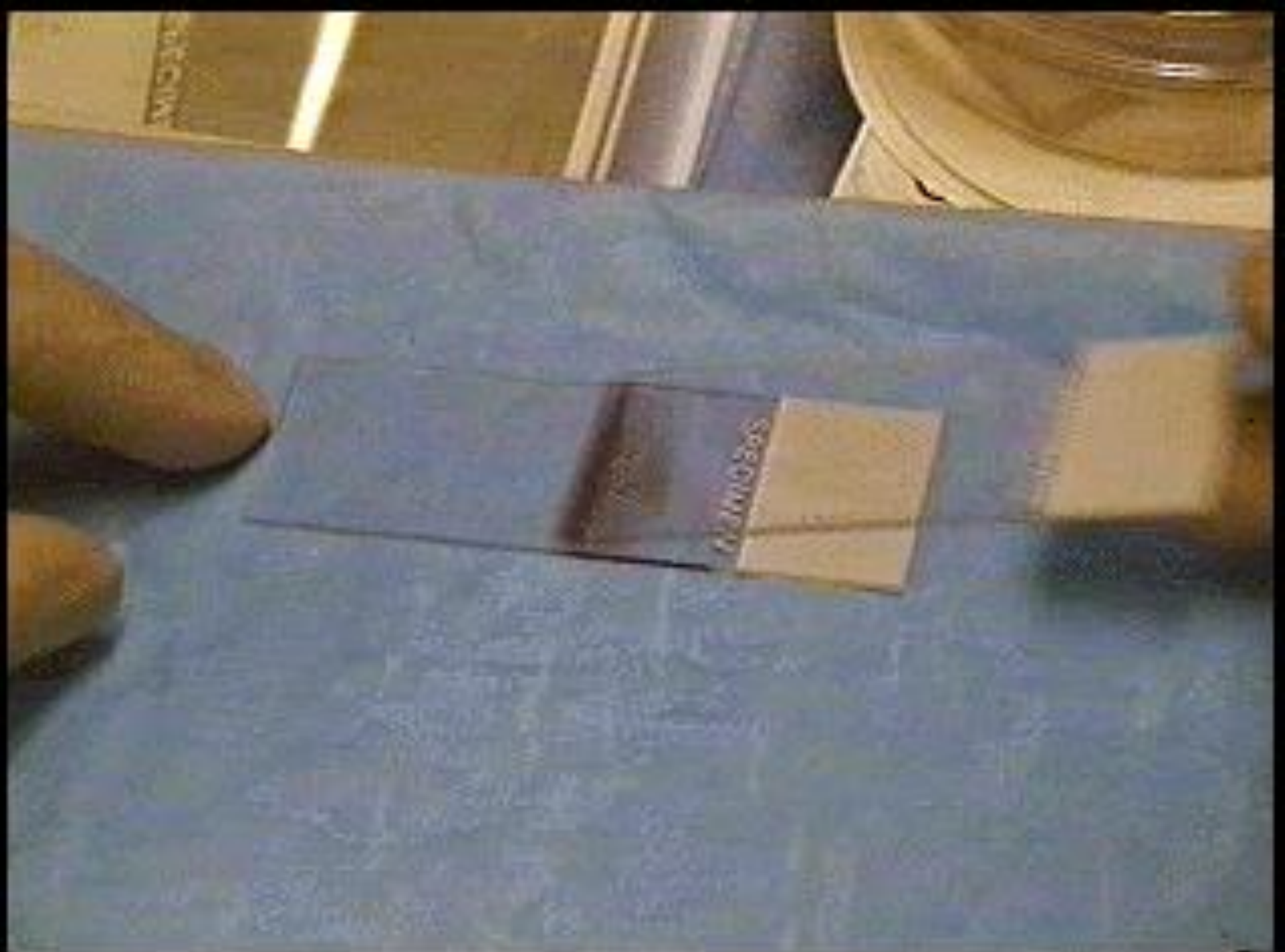


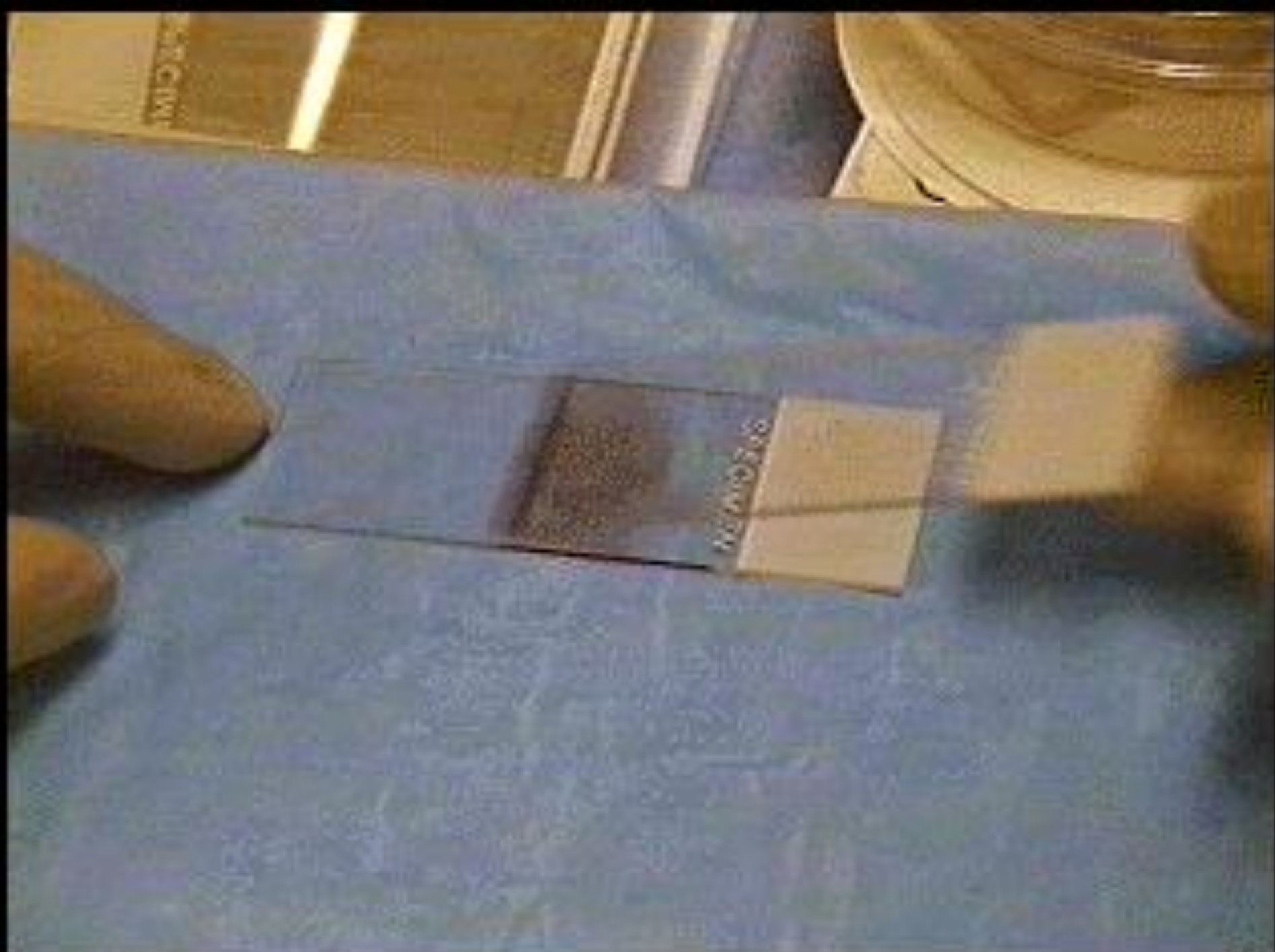


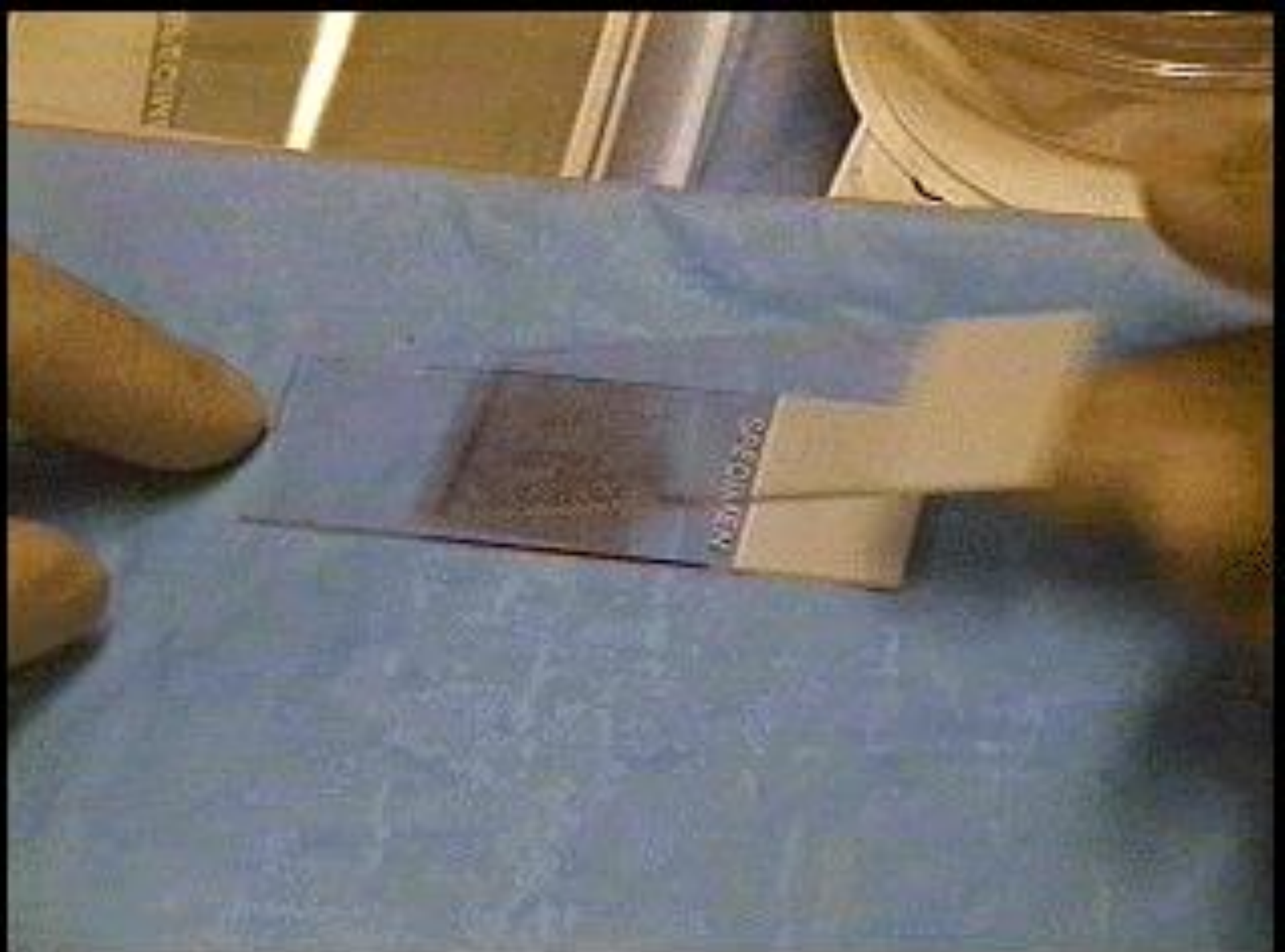


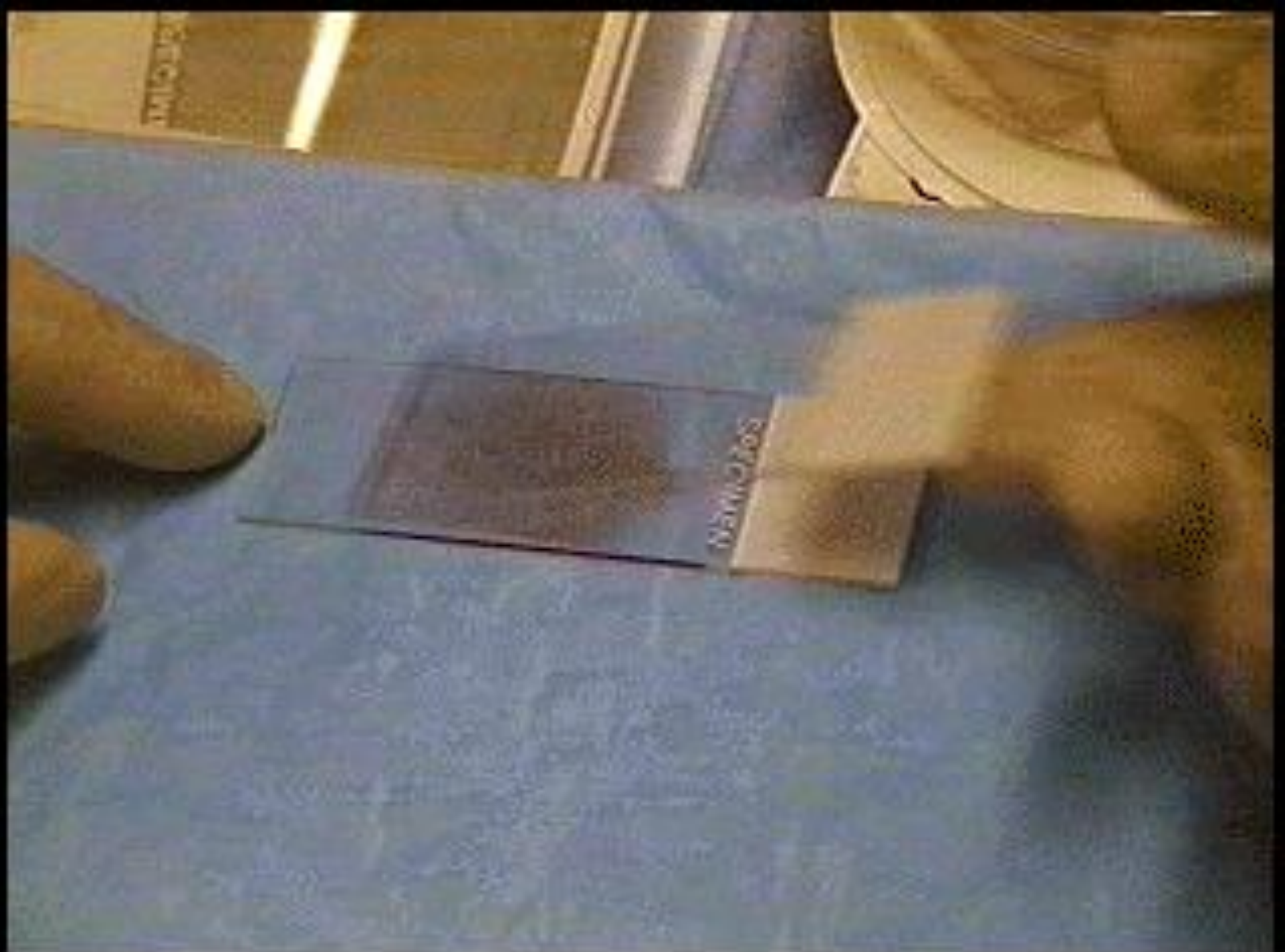


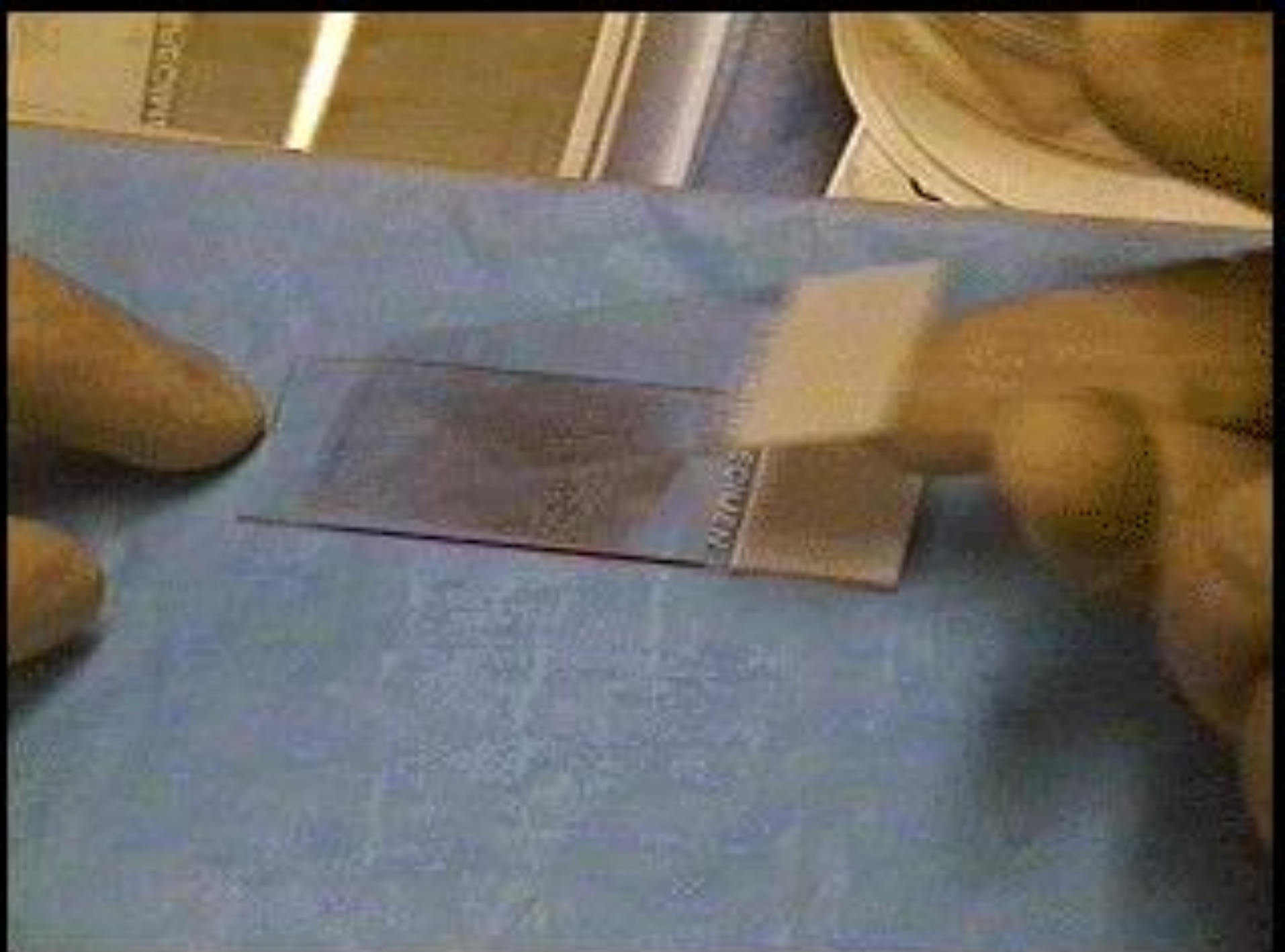


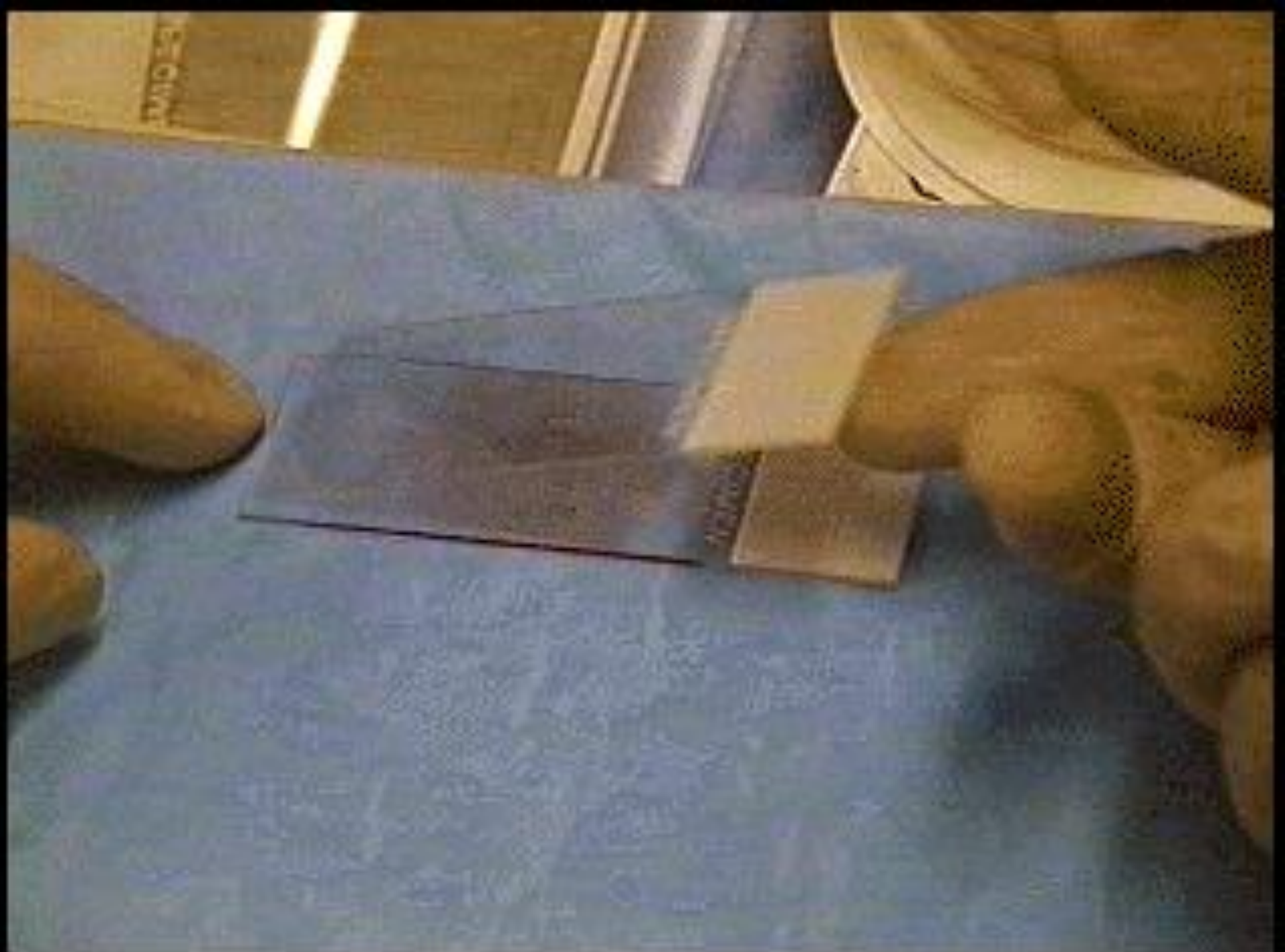


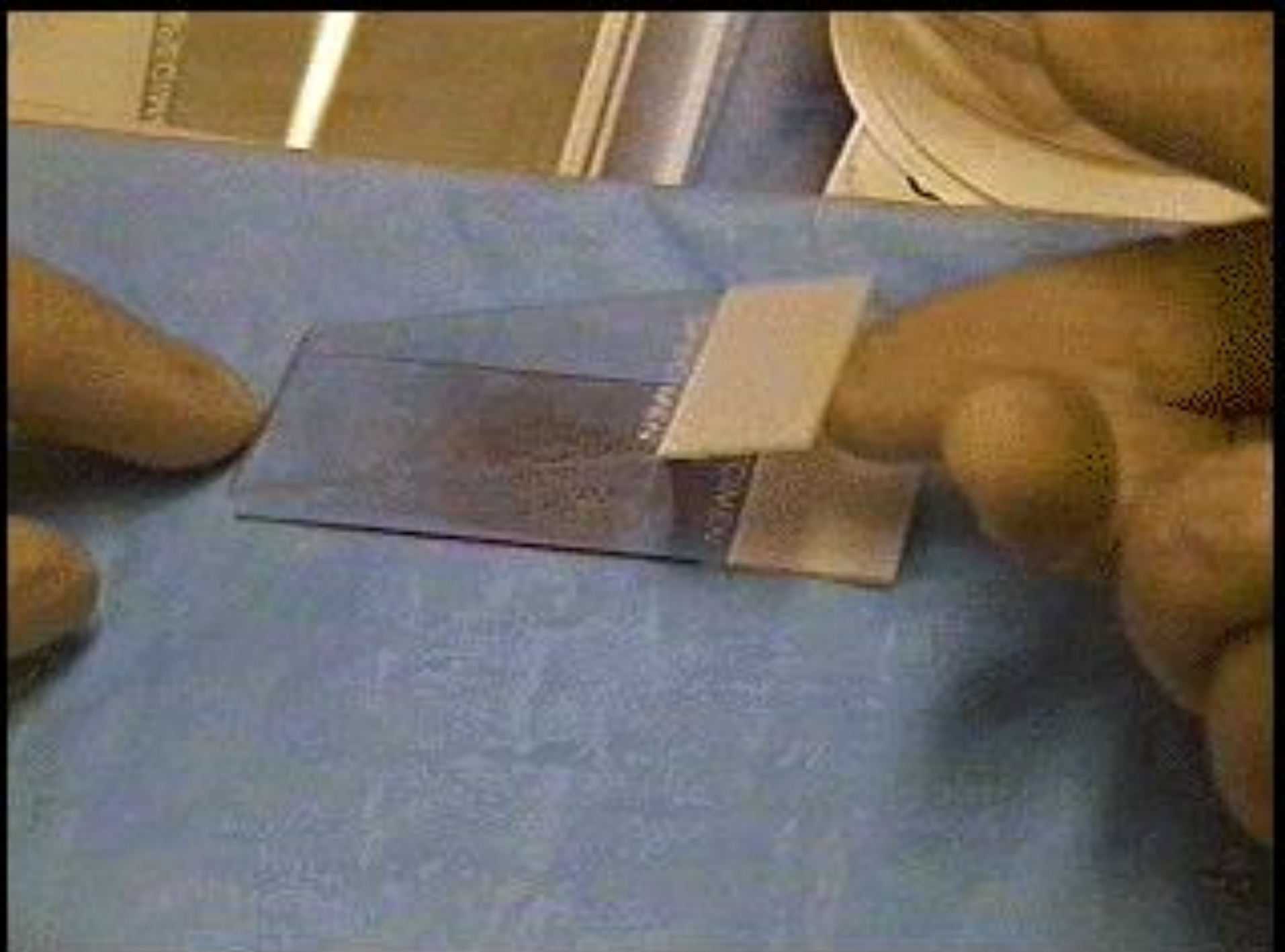


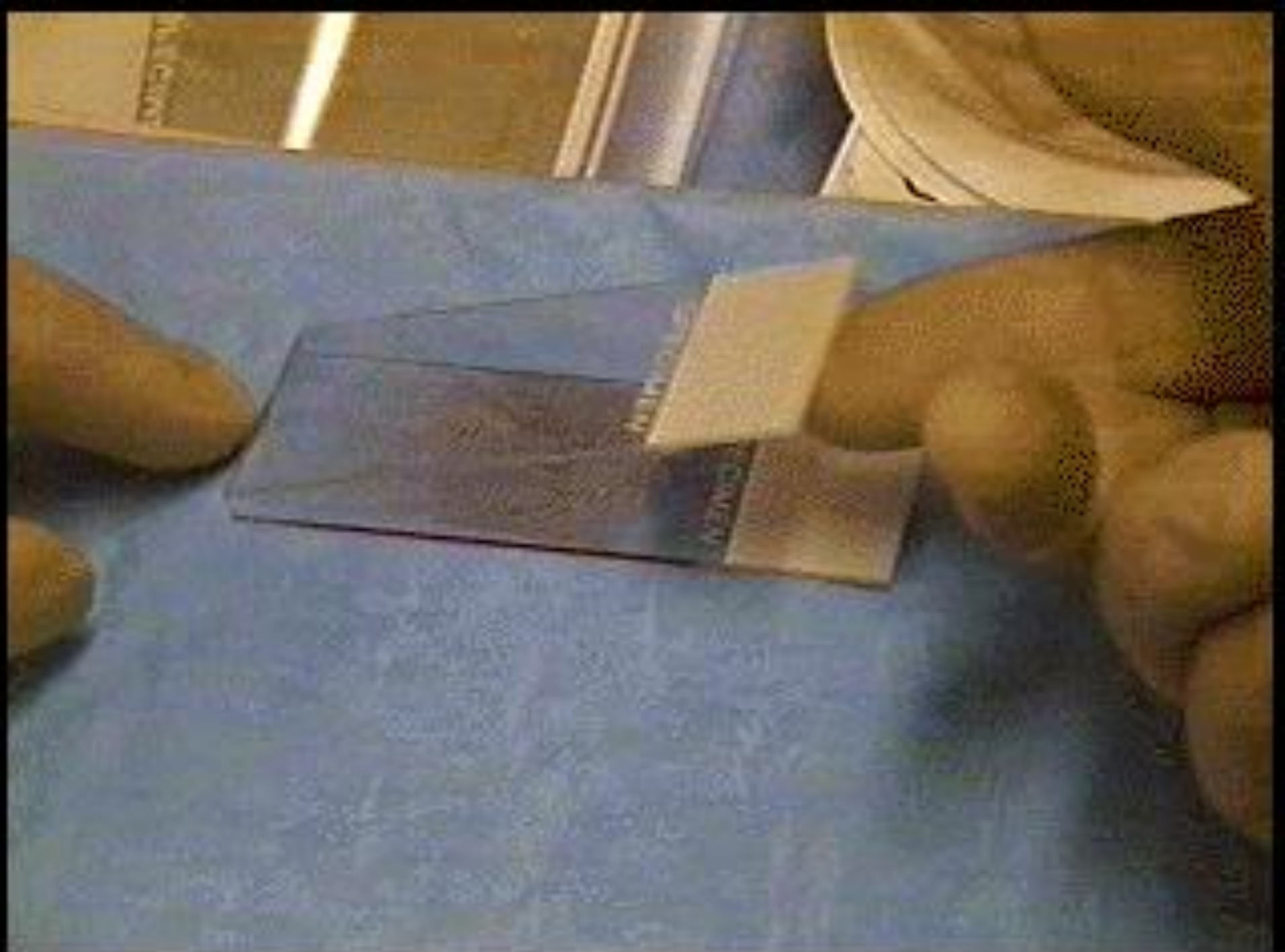


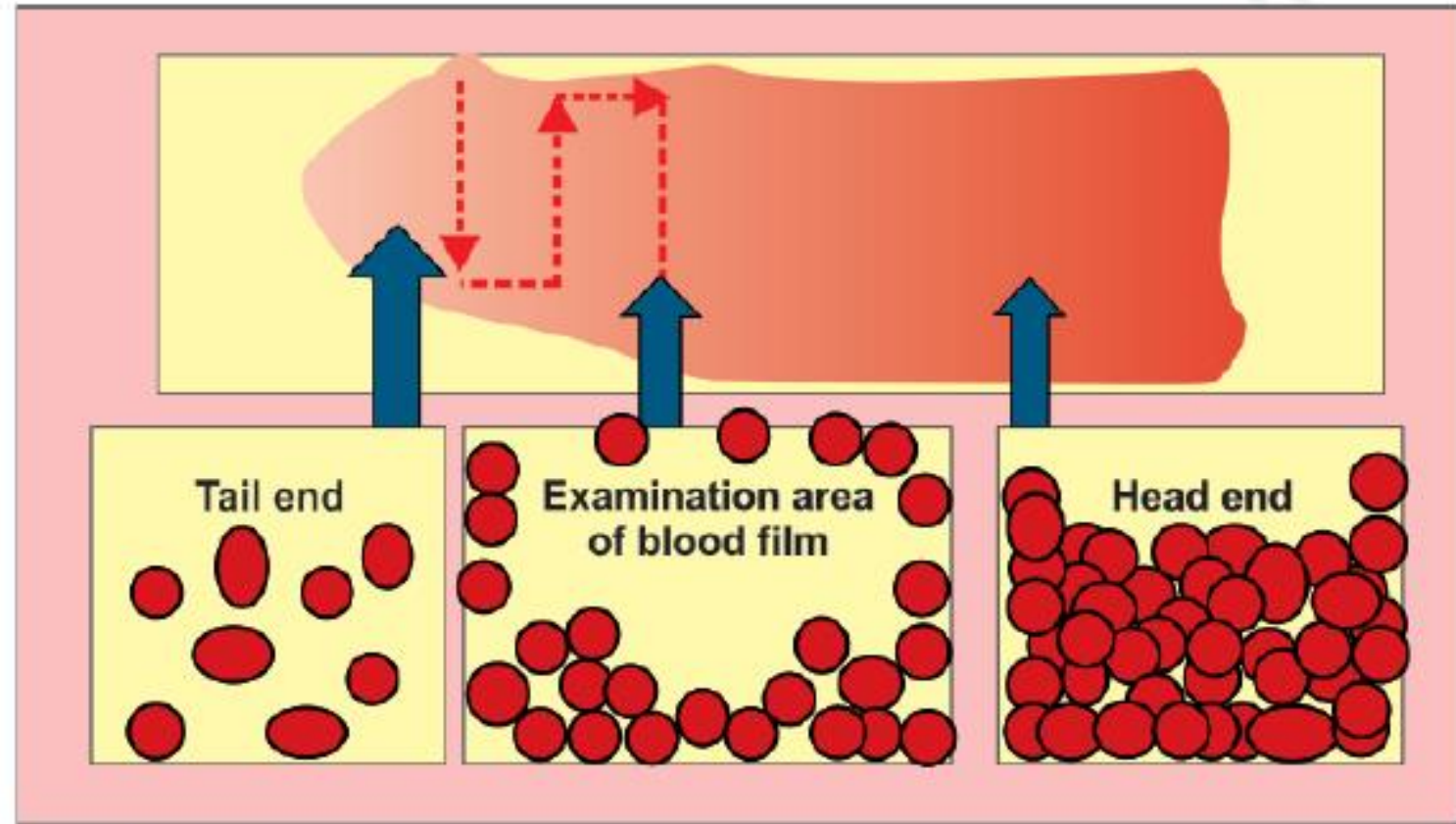
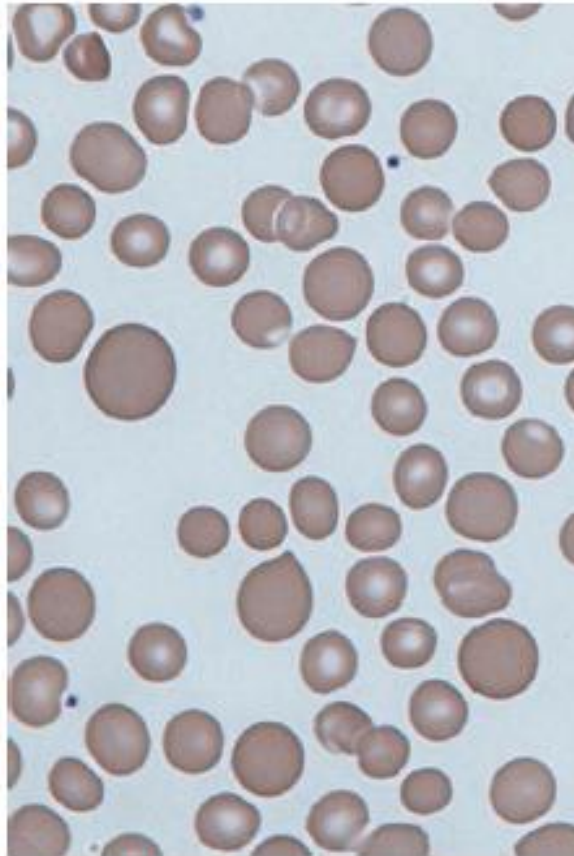






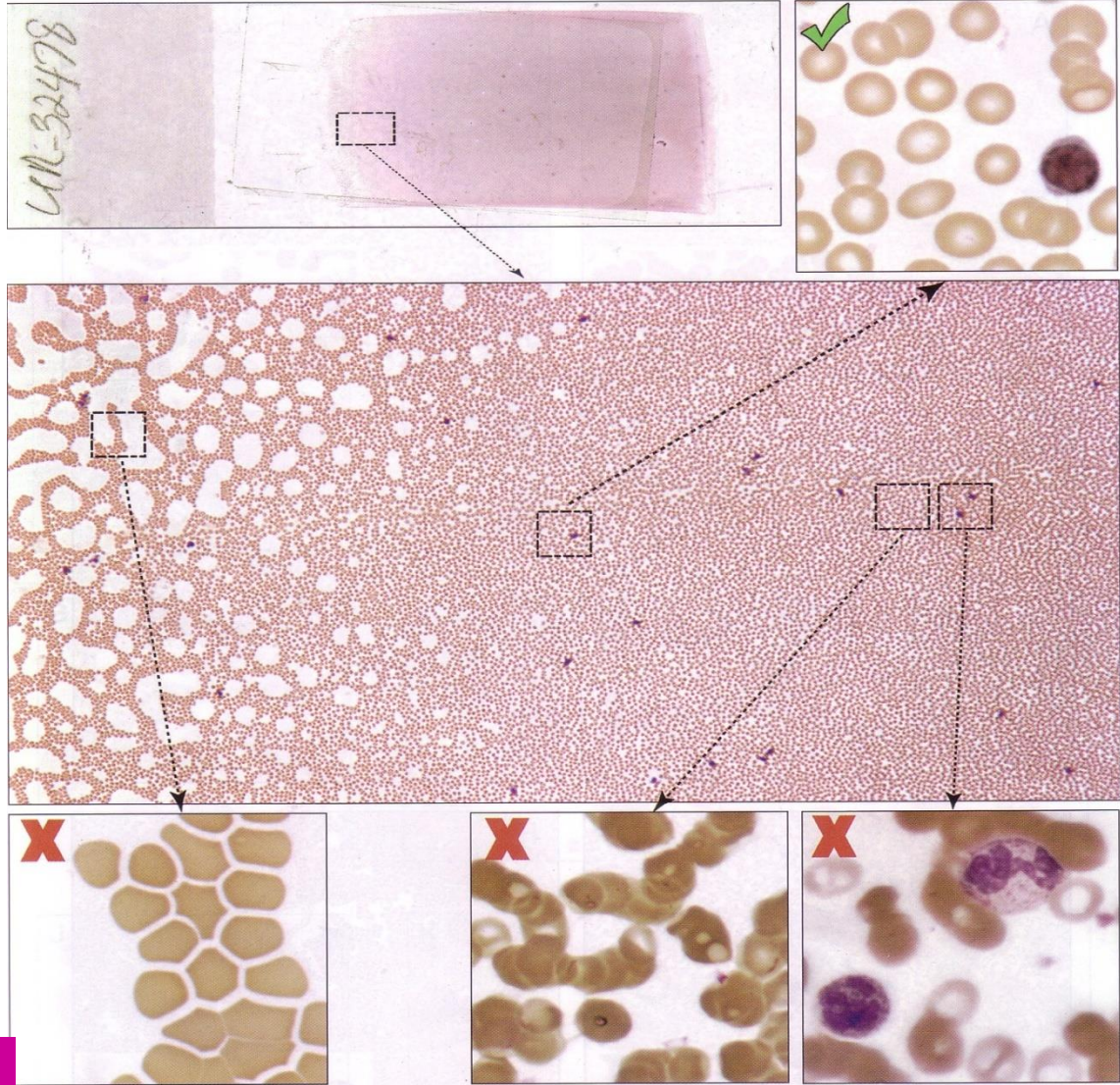






شکل ۶۶-۱۰: لازم به ذکر است که آنیزوسیتوز در سر گستره (گستره به روش گودای یا وینتروب) به دلیل تراکم بالای RBC ها دچار کاهش کاذب و در انتهای گستره به دلیل پهن شدن RBC ها با افزایش کاذب همراه بوده و لذا مطلوب است در بررسی آنیزوسیتوز از جایگاه مخصوص دیف که RBC ها مثل سکه کنار هم بوده و بیش از ۵٪ اریتروسیت ها روی هم سوار نیستند، استفاده شود.

Subfeathery area

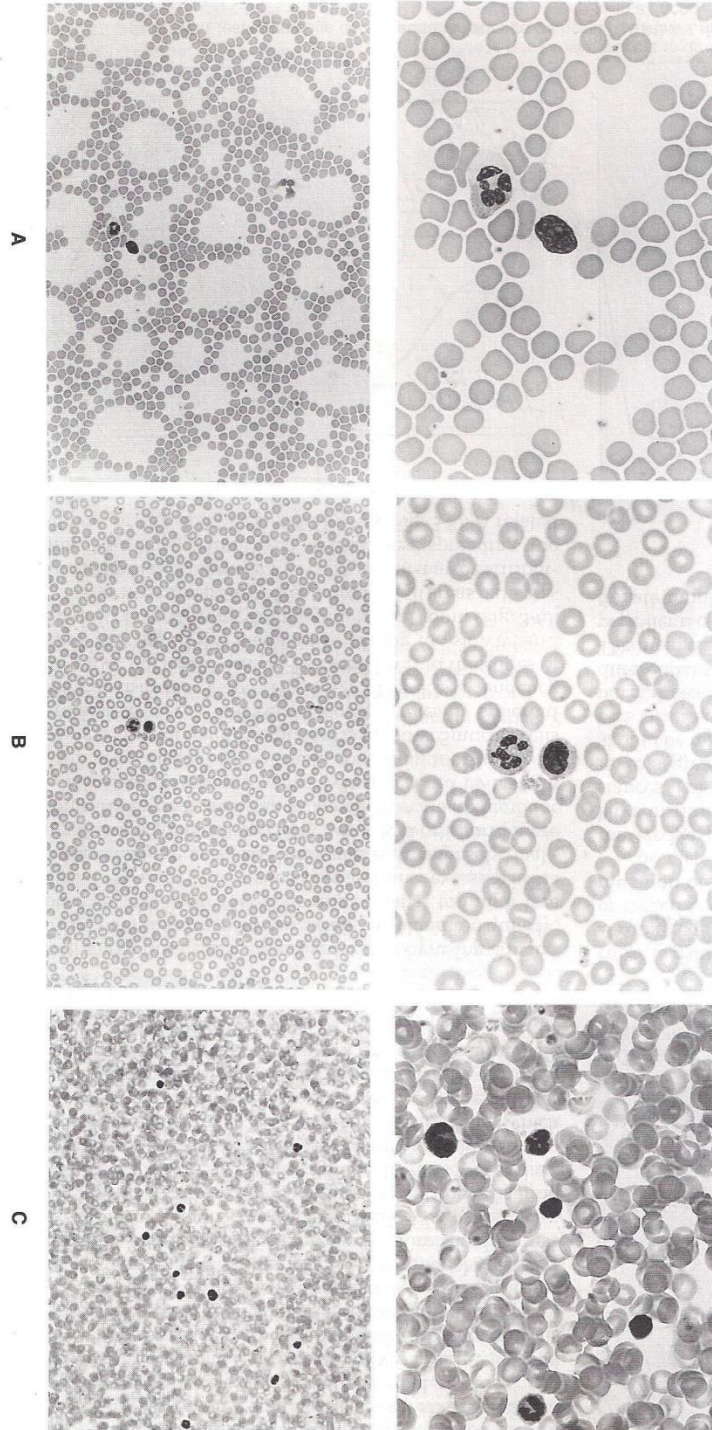
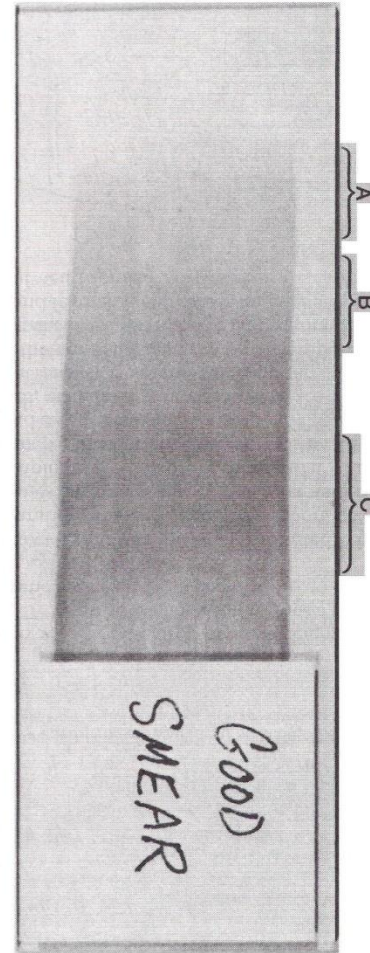


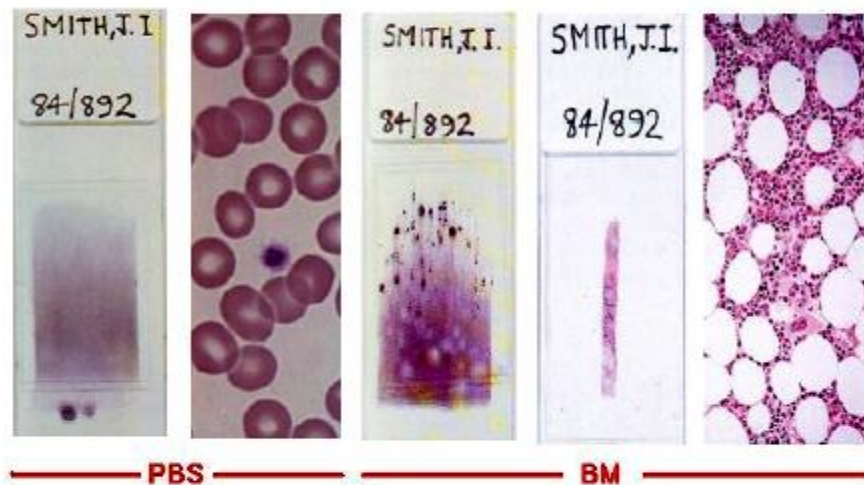
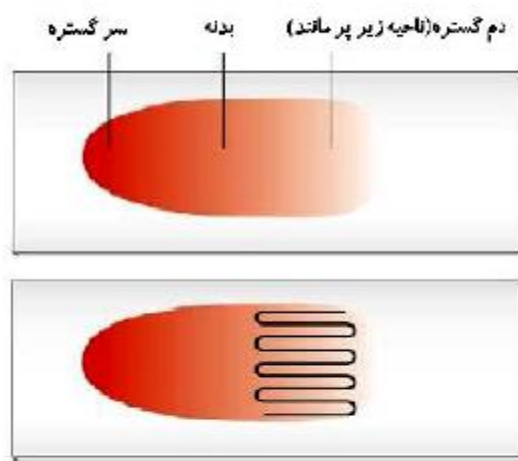
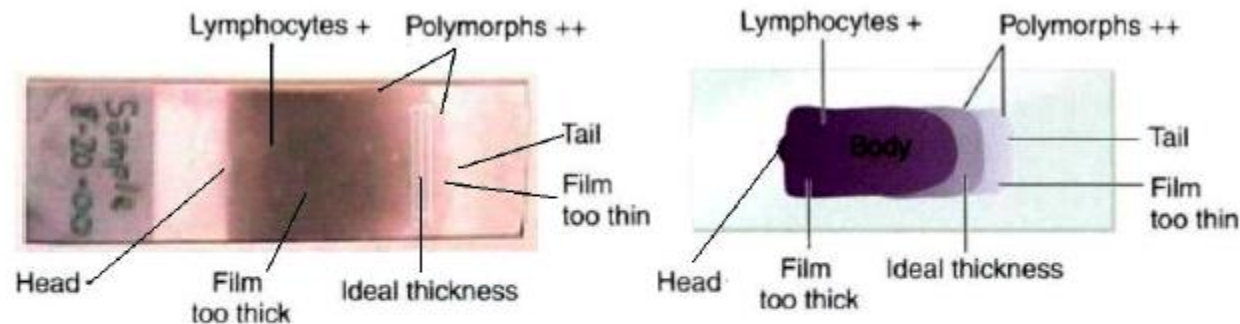
feathery end

Thick area

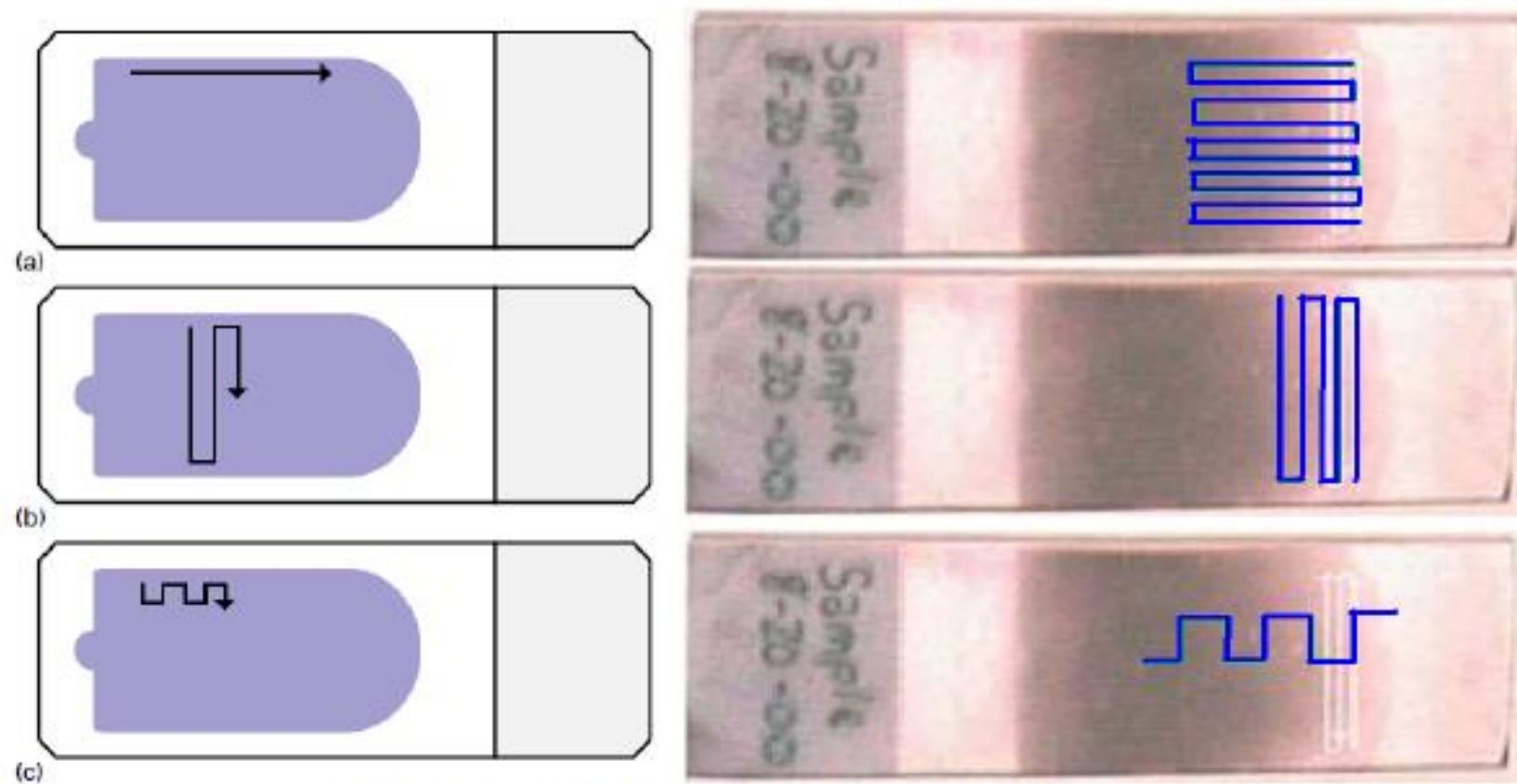
**Figure 8.2.** Microscopic approach to blood films. Selecting the correct area to examine is essential in properly assessing blood films. Regions where red blood cells are well-spaced and almost touch each other are optimal for examining erythrocytes (*right upper panel*). Erythrocytes, when examined too closely to the edge of the slide, appear misshapen and falsely hyperchromic (*left lower panel*), whereas those too distant often appear shrunk and aggregated (*right lower panels*).

منظره سلول‌ها در سه جایگاه مختلف گستره خون محیطی که در نواحی ضخیم یا سر گستره (C) به دلیل تراکم بالای سلولی و تجمع کاذب لنفوسیت‌ها، در نوک ناحیه شعله شمعی یا دم گستره (A) به دلیل خالی بودن برخی از میدان‌ها و تجمع کاذب مونوسیت‌ها و در لبه‌های کناری گستره به دلیل تجمع کاذب نوتروفیل‌ها می‌بایست از انجام دیف اجتناب نمود و حدالمقدور بررسی شمارش افتراقی را فقط در ناحیه زیر پرمانند (B) انجام داد.

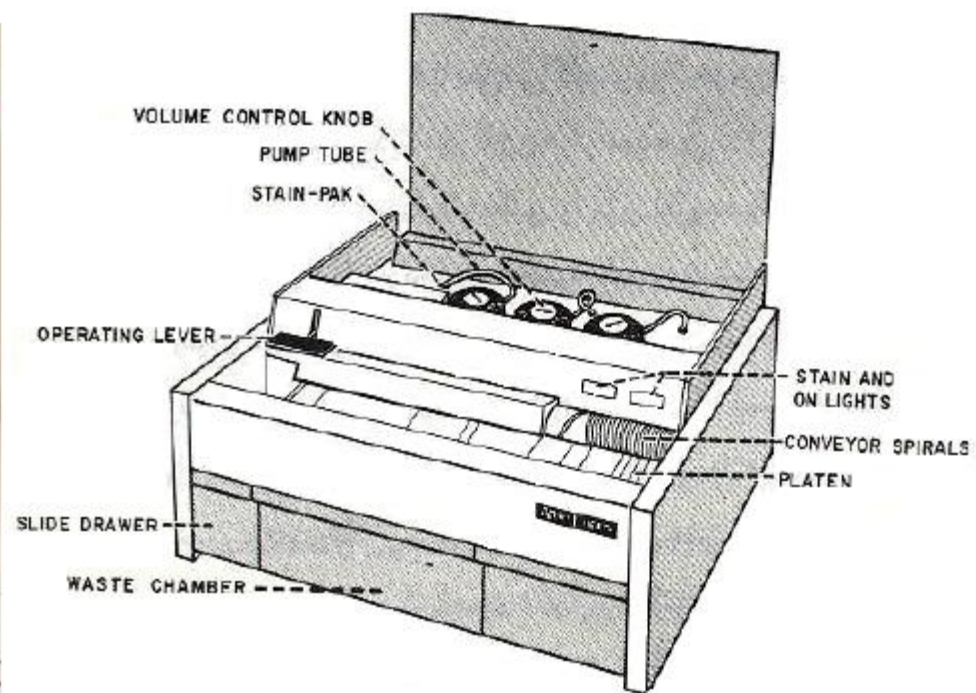




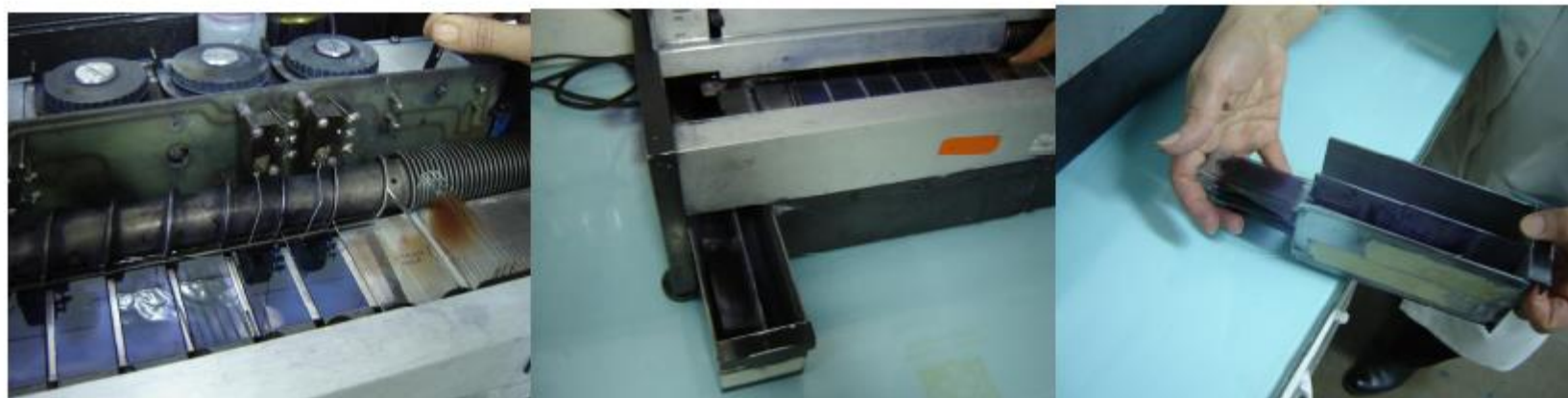
شکل ۳-۷: در شکل سمت چپ یک گسترش شعله شمعی مشاهده می‌شود که ناحیه زیر پرمانند آن برای انجام شمارش افتراقی و بررسی مورفولوژی سلول‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. خطوط زیگزاگ نیز مسیر حرکت لام در زیر میکروسکوپ را نشان می‌دهد. در شکل میانی یک لام PBS استاندارد غیر شعله شمعی را می‌بینید که باز ناحیه زیر پرمانند آن برای بررسی گستره خون محیطی بکار می‌رود ولی در لام میانی، گستره تهیه شده از نمونه آسپیراسیون مغز استخوان را می‌بینید که در آن تکه‌های ریز استخوان و اسپیکول‌های استخوانی به صورت ذرات درشت غیر میکروسکوپی در سطح فروتنی به چشم می‌خورند. در لام سمت راست نیز بیوپسی BM مشاهده می‌شود که از آن برای بررسی سلولاریته BM و سنجش نسبت سلول‌های خون‌ساز به چربی استفاده می‌شود.



شکل ۲۰-۷: سه روش بررسی طولی، عرضی (باتلمنت) و زیگزاگی (باتلمنت اصلاح شده).



شکل ۱۶۰-۱۱: دستگاه رنگ آمیزی اتوماتیک Ames



شکل ۱۴-۷: دستگاه رنگ آمیزی اتوماتیک مارک Ames برای رنگ رایت (با تشکر از بخش هماتولوژی بیمارستان شریعتی).



بافر و رنگ استوک



رنگ غلیظ ۵ دقیقه - رنگ رقیق ۱۰-۱۵ دقیقه آب برای شستشو ۳۰ ثانیه



بافر و رنگ



فیکسایسیون



رنگ غلیظ



بافر



جلائی سمبزی



شستشو

شکل ۱۲-۷: مراحل رنگ آمیزی رایت.

### Phosphate Buffer, Iso-osmotic

|                                                                      |          |
|----------------------------------------------------------------------|----------|
| (A) $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (150 mmol/l) | 23.4 g/l |
| (B) $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (150 mmol/l)                           | 21.3 g/l |

| <i>pH</i> | <i>Solution A</i> | <i>Solution B</i> |
|-----------|-------------------|-------------------|
| 5.8       | 87 ml             | 13 ml             |
| 6.0       | 83 ml             | 17 ml             |
| 6.2       | 75 ml             | 25 ml             |
| 6.4       | 66 ml             | 34 ml             |
| 6.6       | 56 ml             | 44 ml             |
| 6.8       | 46 ml             | 54 ml             |
| 7.0       | 32 ml             | 68 ml             |
| 7.2       | 24 ml             | 76 ml             |
| 7.4       | 18 ml             | 82 ml             |
| 7.6       | 13 ml             | 87 ml             |
| 7.7       | 9.5 ml            | 90.5 ml           |

Normal human serum has an osmolality of  $289 \pm 4$  mmol. Hendry<sup>2</sup> recommended slightly different concentrations of the stock solution, namely, 25.05 g/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  and 17.92 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  for an iso-osmotic buffer.

### Phosphate Buffered Saline

Equal volumes of iso-osmotic phosphate buffer and 9 g/l NaCl.

### Phosphate Buffer, Sørensen's

Stock solutions:

|                                                        | 66 mmol/l | 100 mmol/l | 150 mmol/l |
|--------------------------------------------------------|-----------|------------|------------|
| (A) $\text{KH}_2\text{PO}_4$                           | 9.1 g/l   | 13.8 g/l   | 20.7 g/l   |
| (B) $\text{Na}_2\text{HPO}_4$                          | 9.5 g/l   | 14.4 g/l   | 21.6 g/l   |
| or $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 11.9 g/l  | 18.0 g/l   | 27.1 g/l   |

To obtain a solution of the required pH, add A and B in the indicated proportions:

| <i>pH</i> | <i>A</i> | <i>B</i> |
|-----------|----------|----------|
| 5.4       | 97.0     | 3.0      |
| 5.6       | 95.0     | 5.0      |
| 5.8       | 92.2     | 7.8      |
| 6.0       | 88.0     | 12.0     |
| 6.2       | 81.0     | 19.0     |
| 6.4       | 73.0     | 27.0     |
| 6.6       | 63.0     | 37.0     |
| 6.8       | 50.8     | 49.2     |
| 7.0       | 38.9     | 61.1     |
| 7.2       | 28.0     | 72.0     |
| 7.4       | 19.2     | 80.8     |
| 7.6       | 13.0     | 87.0     |
| 7.8       | 8.5      | 91.5     |
| 8.0       | 5.5      | 94.5     |

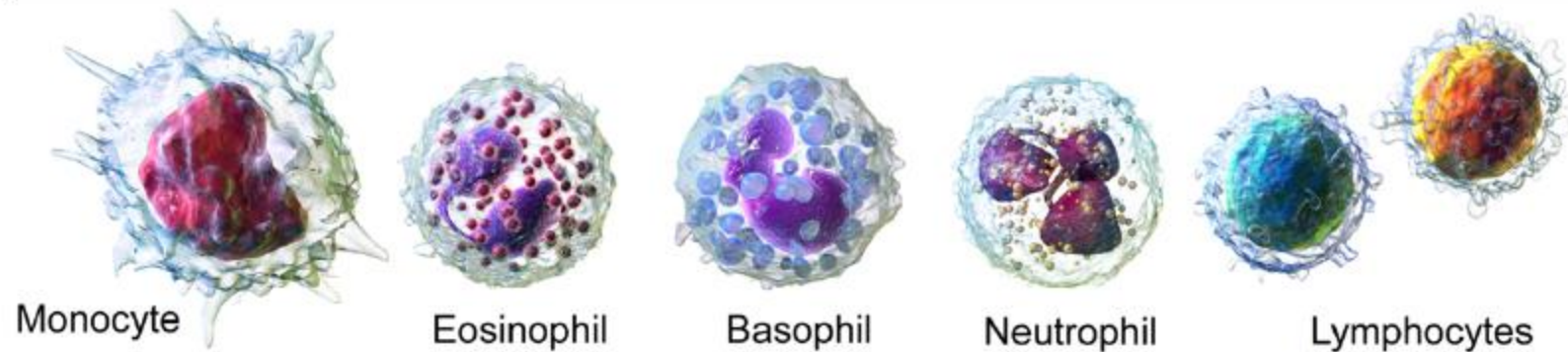
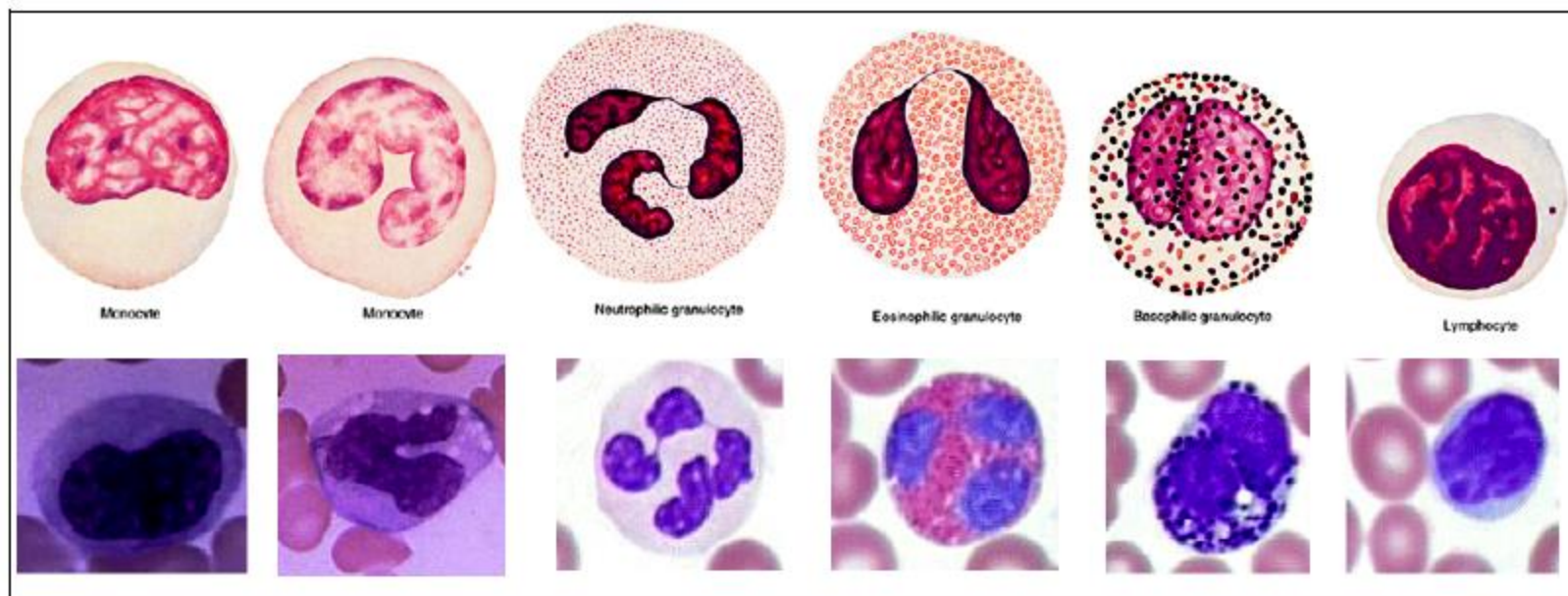
This buffer is not iso-osmotic with normal plasma



شکل ۱۱-۱: دیمیتری لئونیدوویچ رومانفسکی (۱۸۶۱-۱۹۲۱) و آقای پل ارلیخ (۱۸۵۴-۱۹۱۵) که ابتدا سال ۱۸۷۹ آقای ارلیخ رنگ متیلن بلو را با رنگ اسیدی فوشین مخلوط می‌کرد ولی در سال ۱۸۹۱ اولین بار آقای رومانفسکی رنگ متیلن بلو را با رنگ اسیدی اتوزین لا مخلوط کرد و به یک رنگ بسیار زیبای آبی-قرمز-بنفش دست یافت که وجه افتراق بالایی داشت.



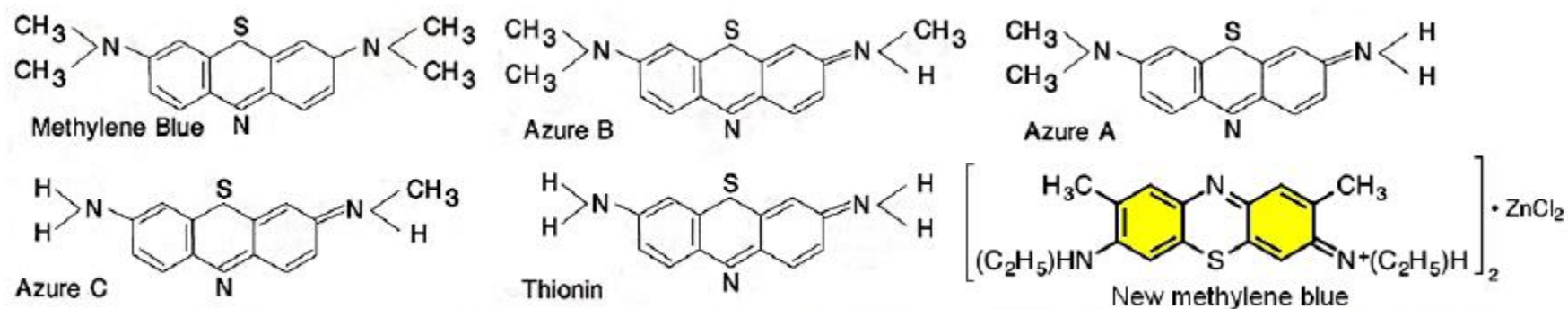
شکل ۱۱-۱: آقای هانس کریستین گرم (۱۸۵۳-۱۹۳۸)، باکتریولوژیست دانمارکی، ژان گوئیلوم آگوست لوگول (۱۷۸۶-۱۸۵۱) باکتریولوژیست فرانسوی، دکتر جیمز هومر رایت<sup>۲</sup> (۱۹۲۸-۱۸۶۹) پاتولوژیست آمریکایی و آقای سر ویلیام بووگ لیشمن (۱۸۶۵-۱۹۲۶) پاتولوژیست ارتش انگلیس. آقای لیشمن و رایت اولین بار از متانول به عنوان حلال رنگ رومانفسکی استفاده کردند. آقای لیشمن روی رنگ آمیزی مالاریا و کالآزار احشایی در هند کار می‌کردند که بعدها به افتخار وی، به بیماری لیشمانیای احشایی تغییر نام یافت و به تریپانوزومیای مربوطه نیز لیشمانیا گفته شد. ایشان تحقیقات ارزنده‌ای نیز در مورد اسپروکت و کلبسیلا داشتند.



شکل ۱۰-۷: رنگ آمیزی لکوسیت‌های خونی در استفاده از رنگ‌های خانواده رومانوفسکی. انوزینوفیل‌ها می‌توانند ۳-۴ لوب در هسته خود داشته باشند.



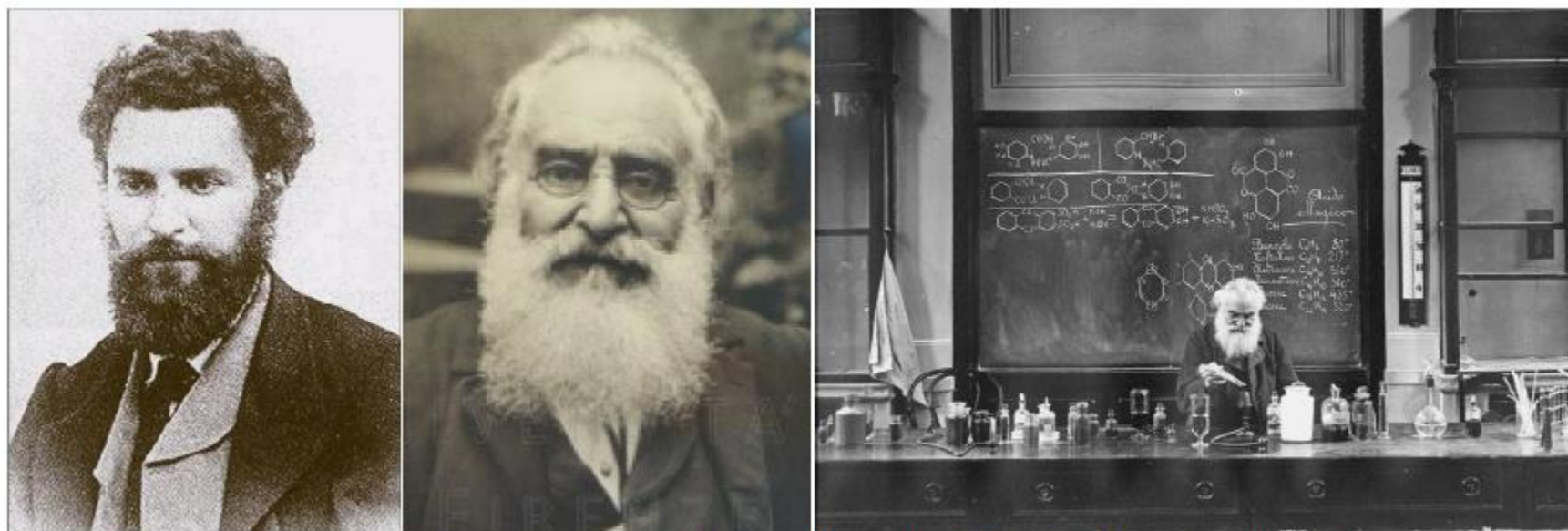
شکل ۱۱-۱: آرتور هاین (۱۸۷۰-۱۹۱۶) که اجسام پاپن هاینر با ماهیت آهن را در رنگ آمیزی روماتیسمی توصیف نمود، آقای رابرت فولگن (۱۸۸۴-۱۹۵۵) که اولین بار در سال ۱۹۱۴ موفق به رنگ آمیزی DNA و هسته نمود. آقای کلود پییر میسون (۱۸۸۰-۱۹۵۹) <sup>۳</sup> پاتولوژیست فرانسوی-کاتادایی که موفق به ابداع روش سه رنگی میسون شد. در این رنگ آمیزی کلاژن به رنگ آبی-سبز، سلول های عضله، عصب و کراتین به رنگ قرمز و هسته سلول ها به رنگ قهوه ای پررنگ دیده می شود.



شکل ۹-۷: فرمول ساختاری انواع رنگ های تiazینی که البته NMB یک رنگ حیاتی (Supra Vital) محسوب می شود. دمتیلاسیون متیلن بلو در حضور حرارت و مواد قلیایی صورت می گیرد.

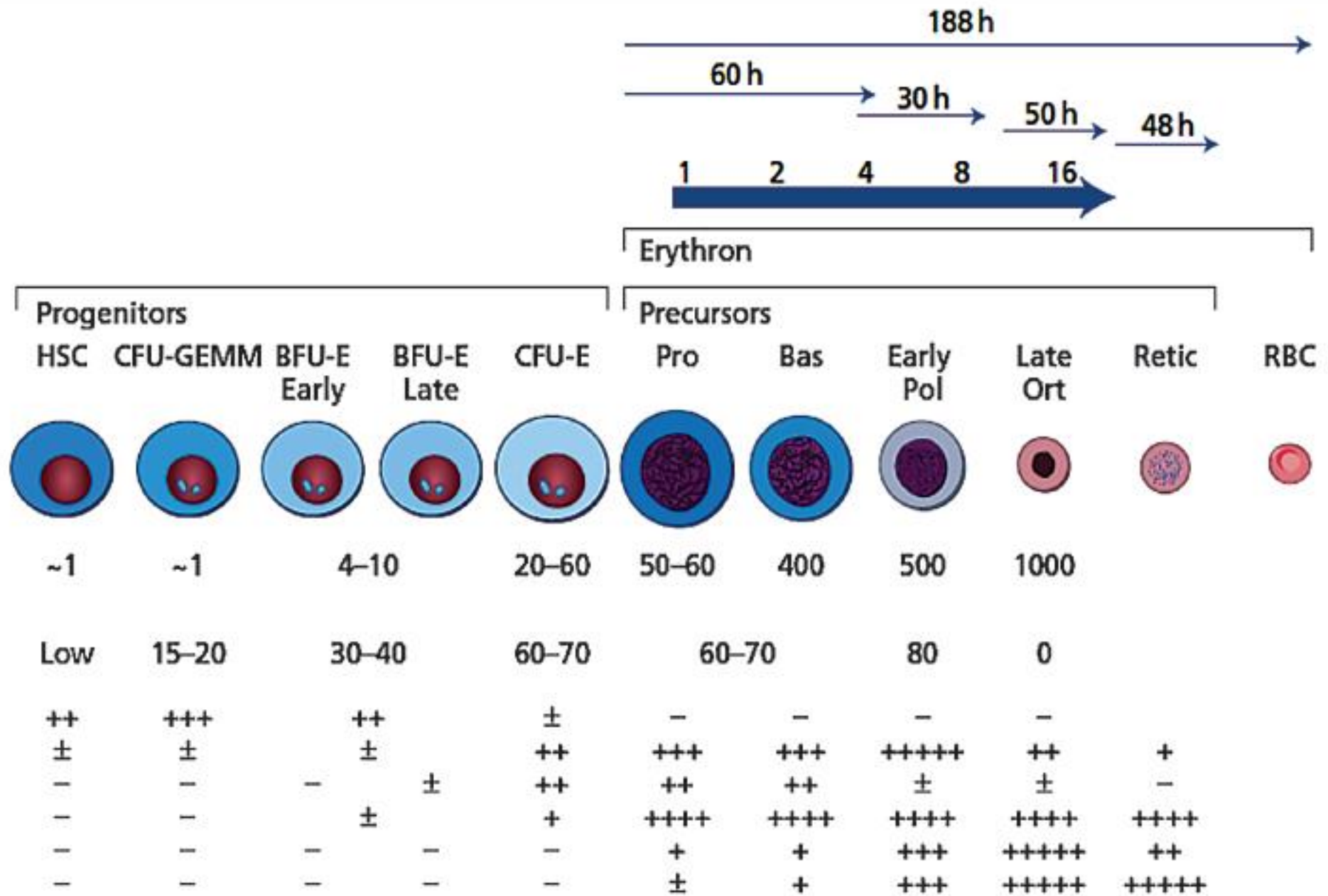


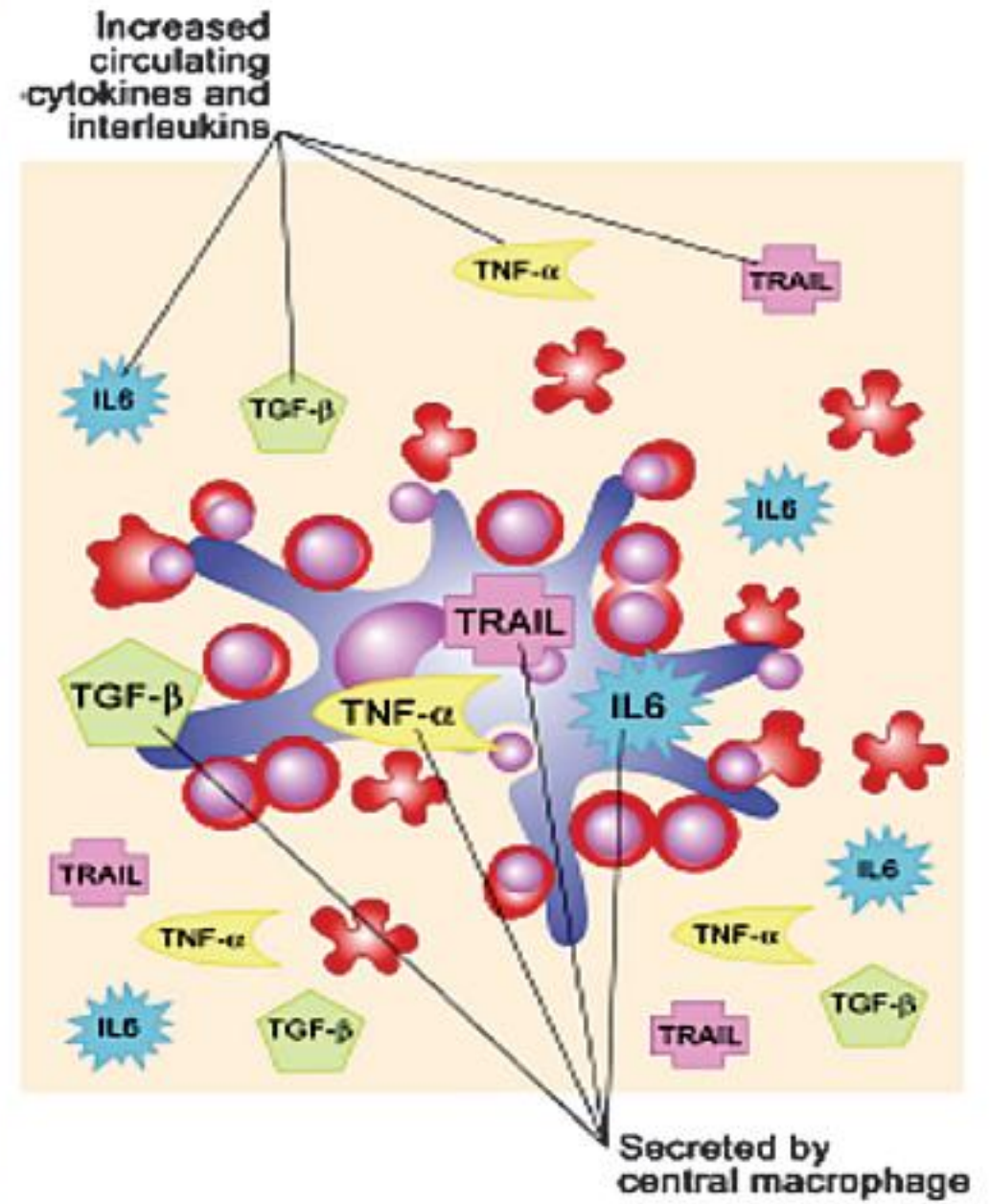
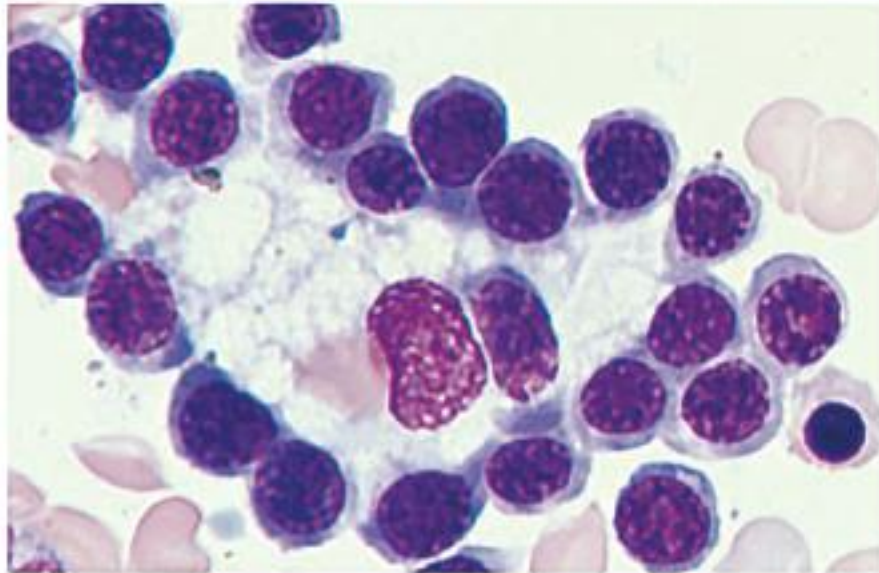
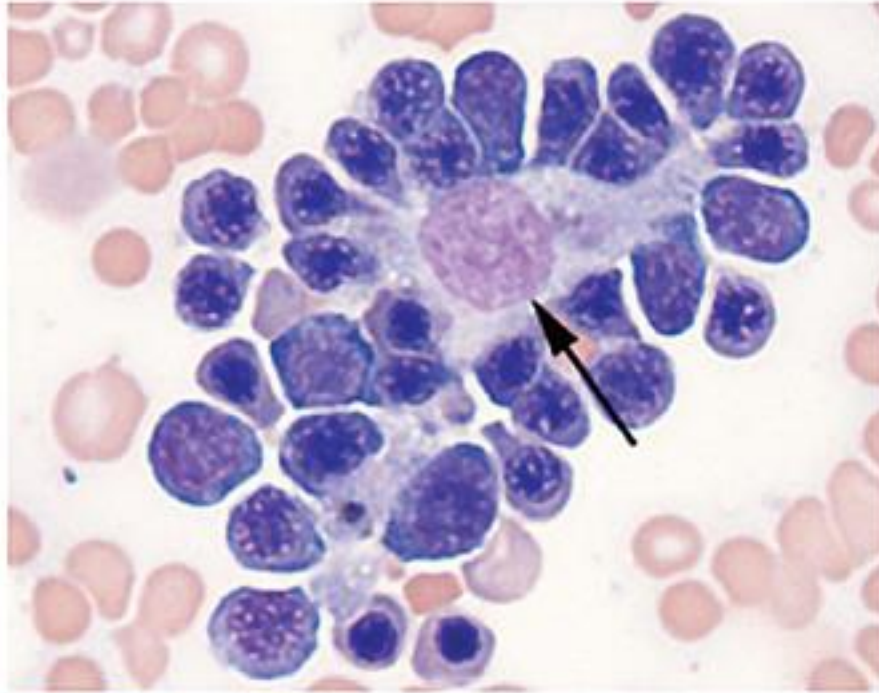
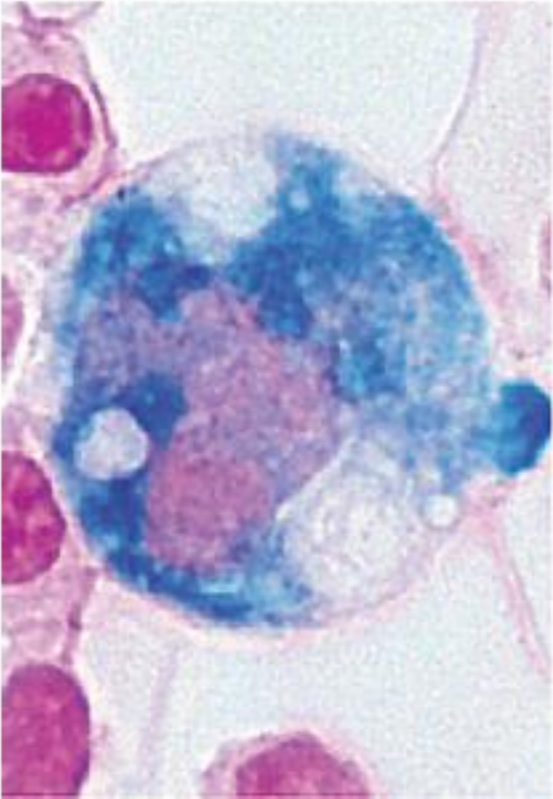
شکل ۱۱-۱: دکتر ریچارد می (۱۸۶۳-۱۹۳۶)، دکتر لودویگ گرونوالد (۱۸۶۲-۱۹۴۳) و دکتر گوستاو گیمسا<sup>۱</sup> (۱۸۶۷-۱۹۴۸) که هر سه دانشمند اهل آلمان بوده و در ابداع رنگ MGG نقش داشتند. آقای گیمسا با افزودن گلیسرول پایداری، تکرارپذیری و نفوذپذیری رنگ را افزایش داد تا انگل مالاریای داخل RBC نیز به خوبی رنگ بگیرد. رنگ آمیزی MGG پروسه ۶۰ دقیقه‌ای داشته و به دلیل داشتن متانول در رنگ، الزامی به فیکس کردن ندارد. نفرات بعدی، سر ویلیام جنر (۱۸۱۵-۱۸۹۸) و جان ویلیام فیلد (۱۸۶۱-۱۹۴۴) هستند که ابداع گران رنگ‌های جنر و فیلد از مجموعه رنگ‌های رومانفسکی هستند. رنگ آمیزی فیلد دو مرحله A (رنگ با متیلن بلو و آزرور) و B (انوزین) دارد که هر دو رنگ در بافر فسفات حل می‌شوند.

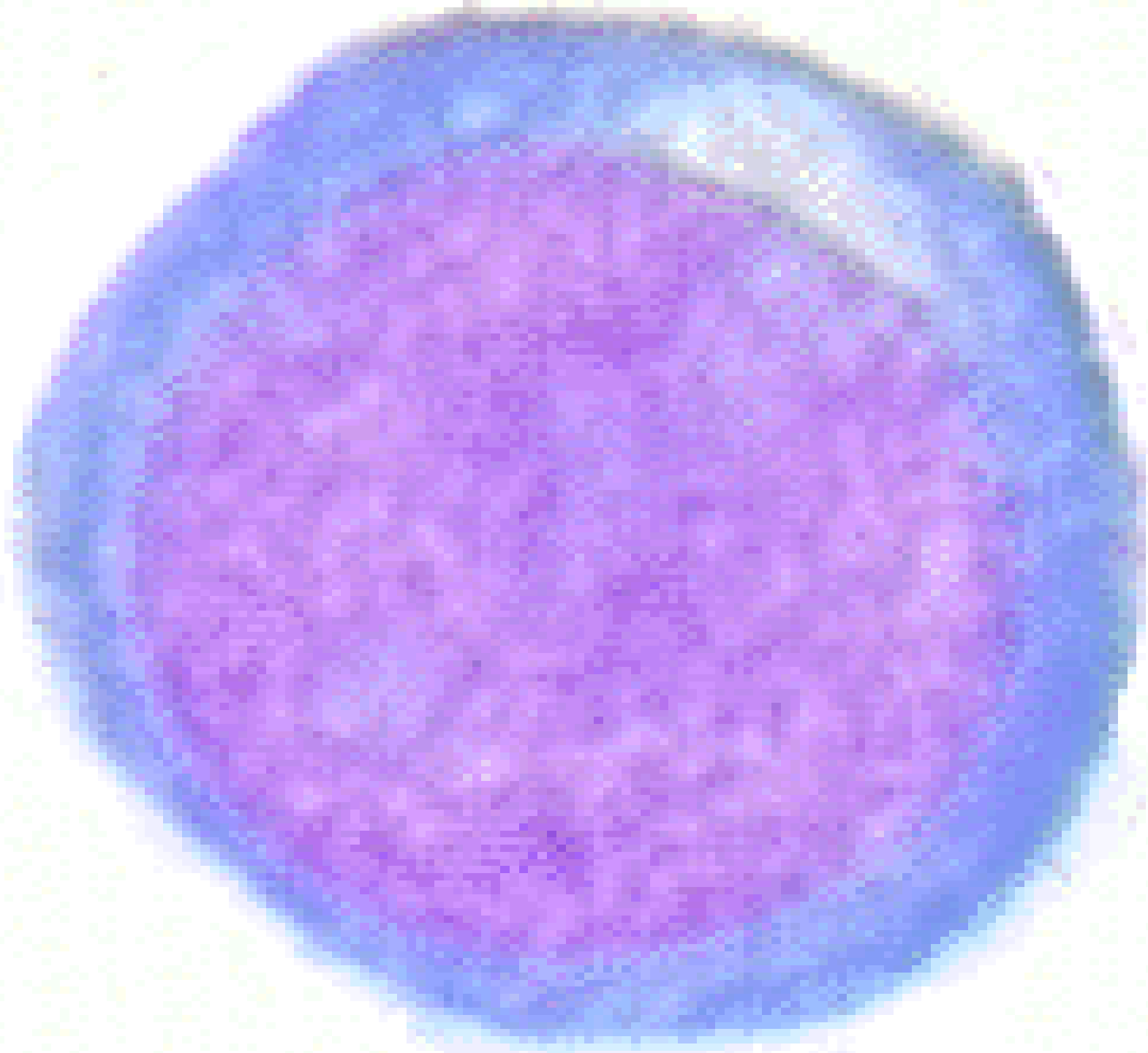


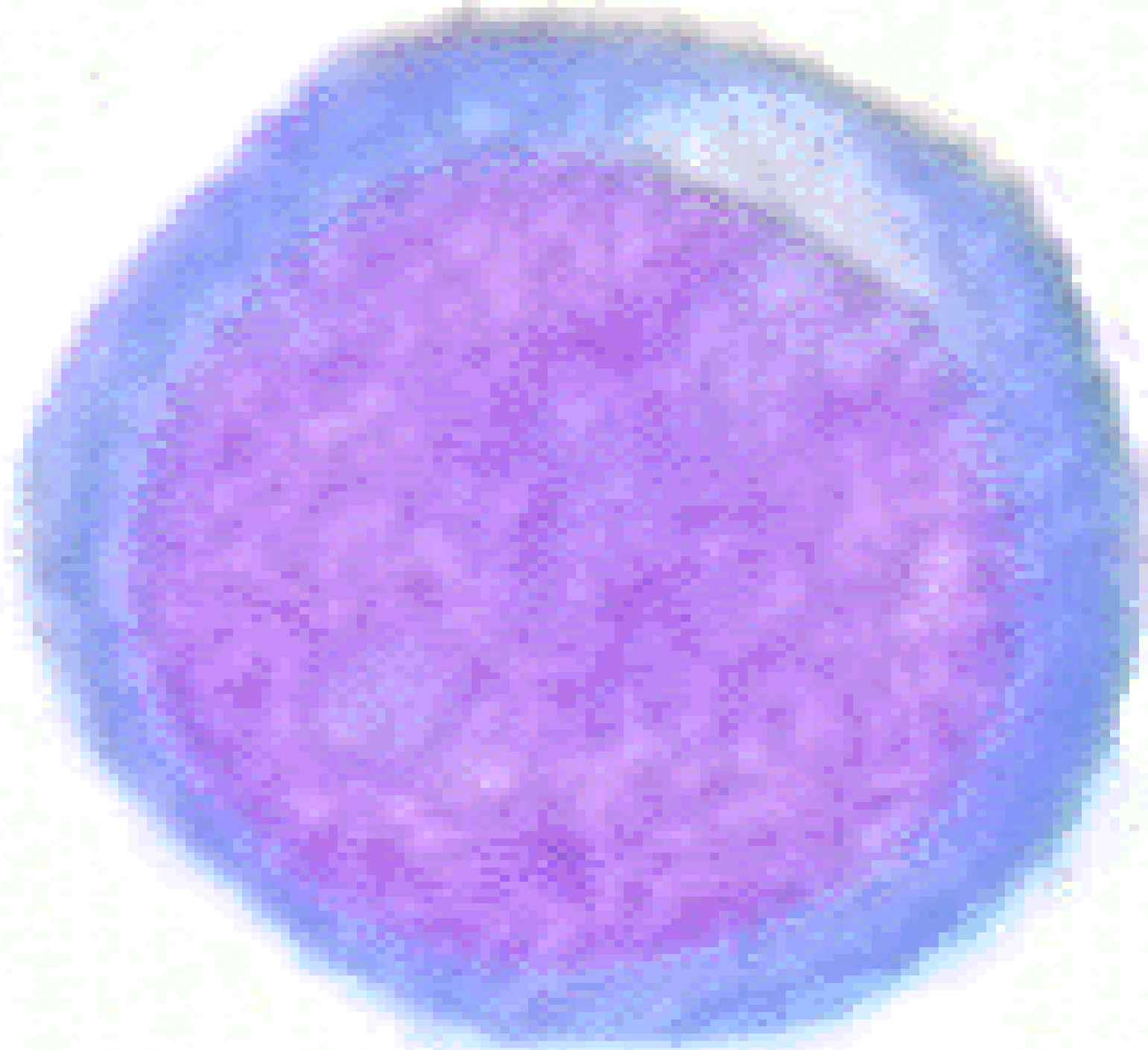
شکل ۱۱-۱: هوگو شیف<sup>۲</sup> (۱۸۳۴-۱۹۱۵)، دانشمند آلمانی و ابداع کننده رنگ PAS که قسمت زیادی از عمر خود را در ایتالیا سپری نمود.

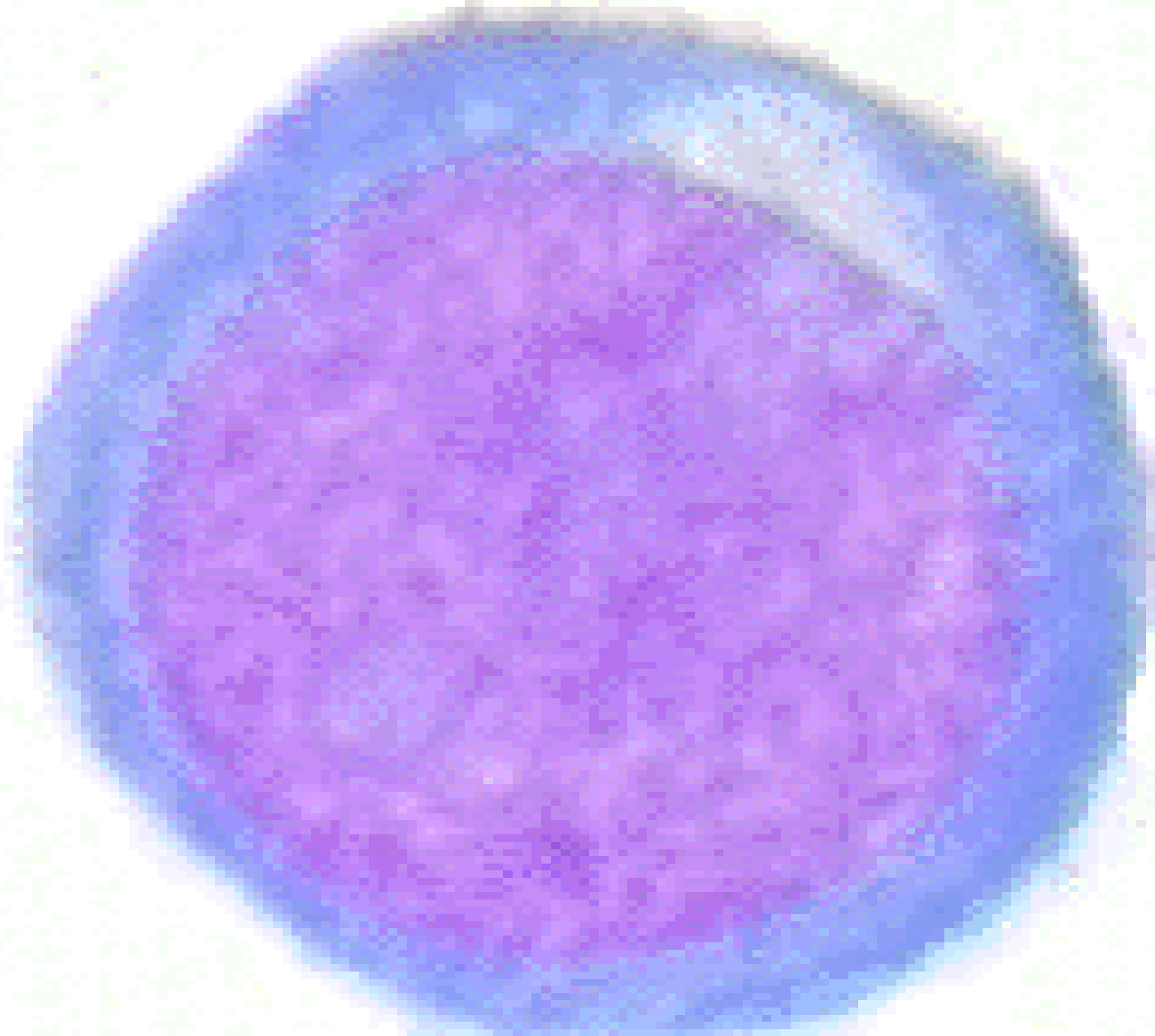
# ERYTHROPOIESIS

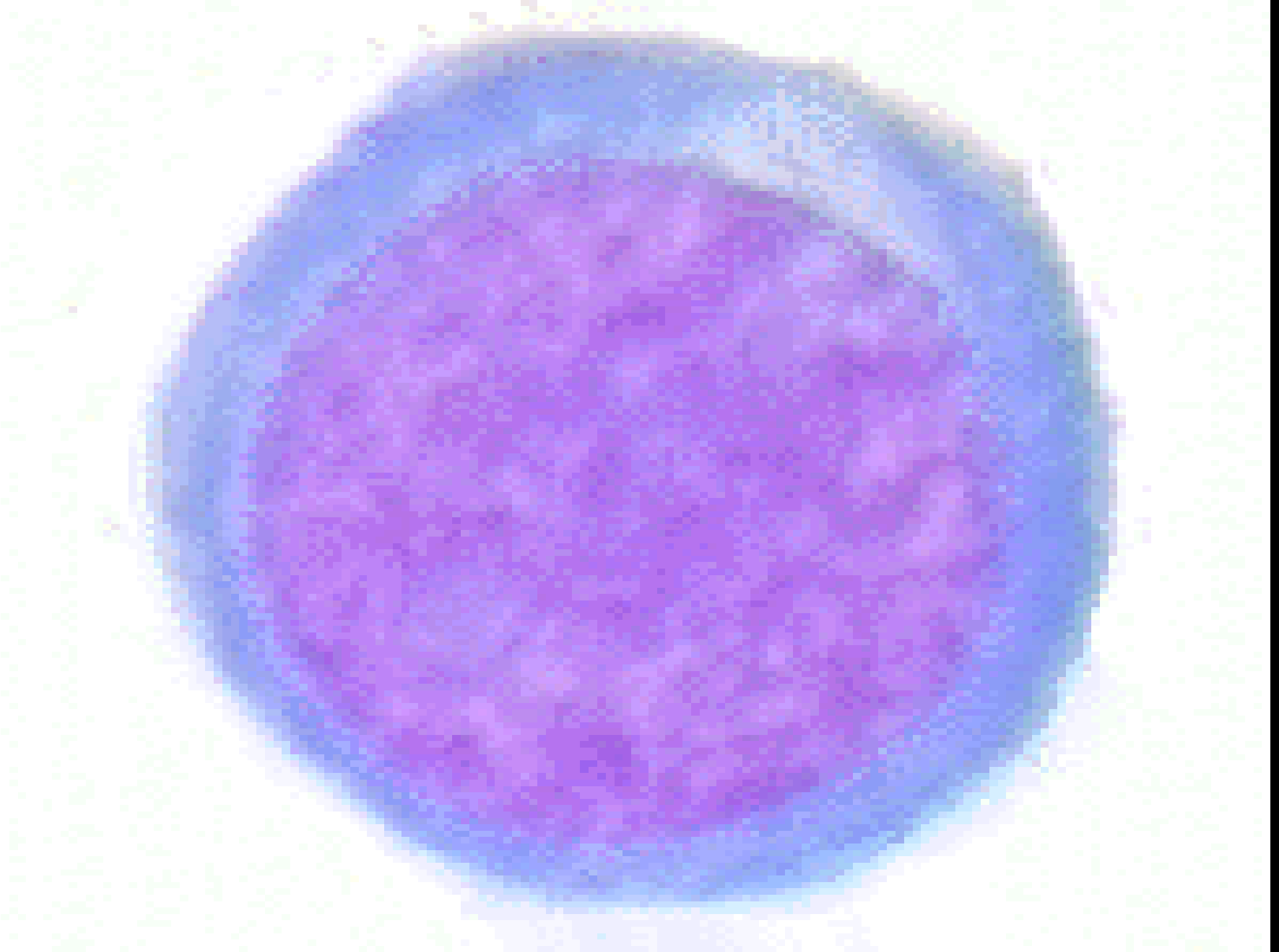


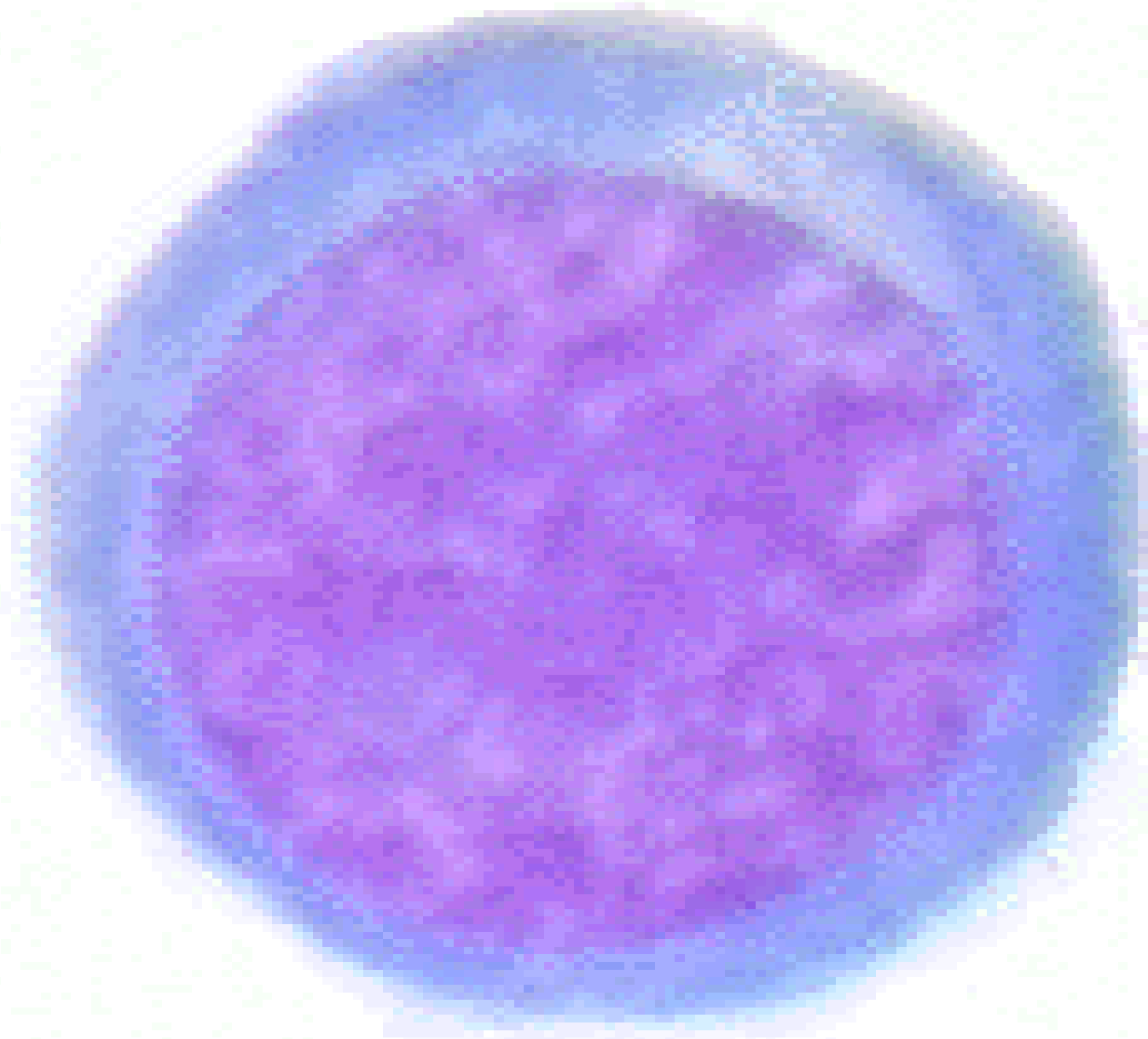


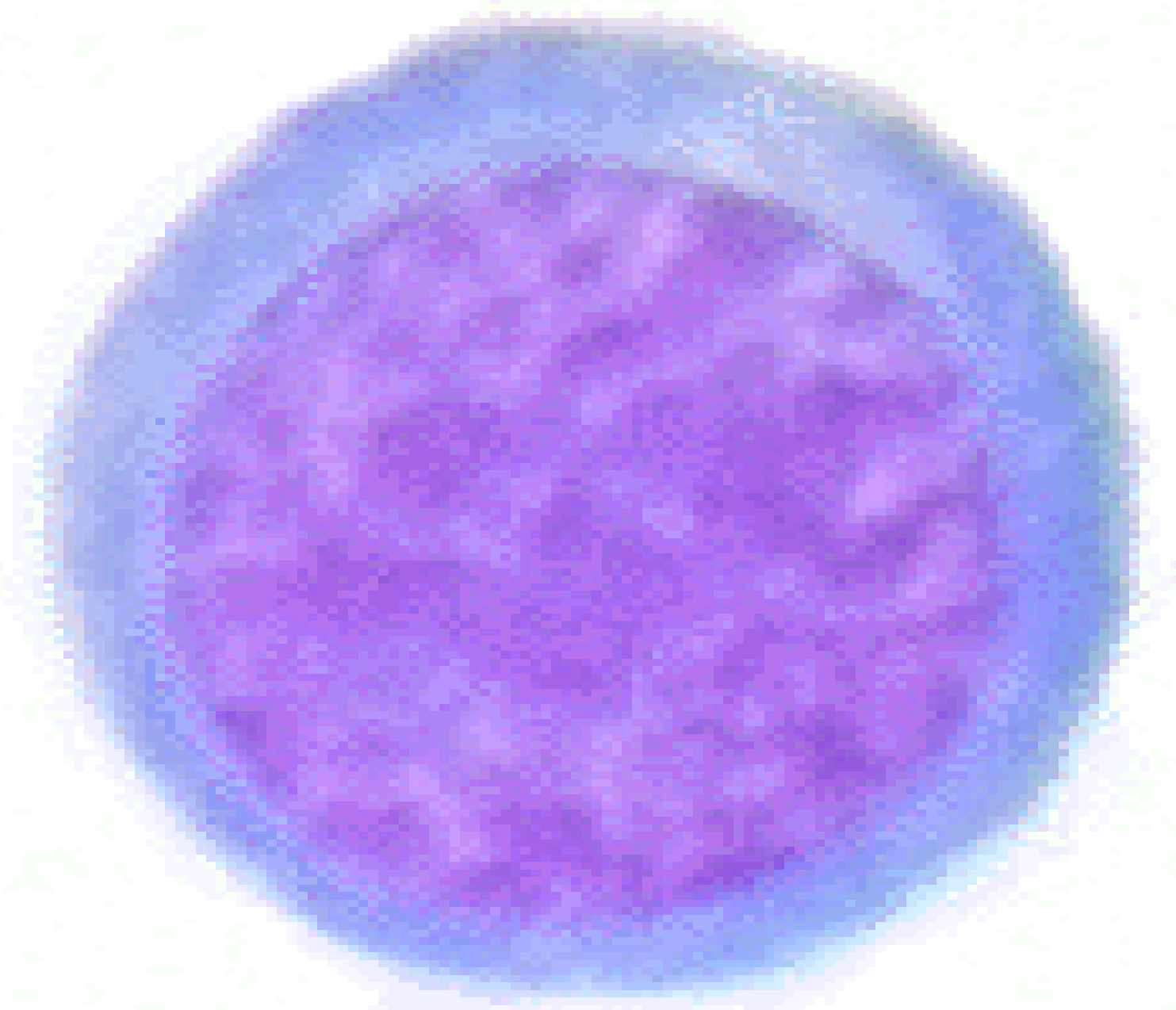


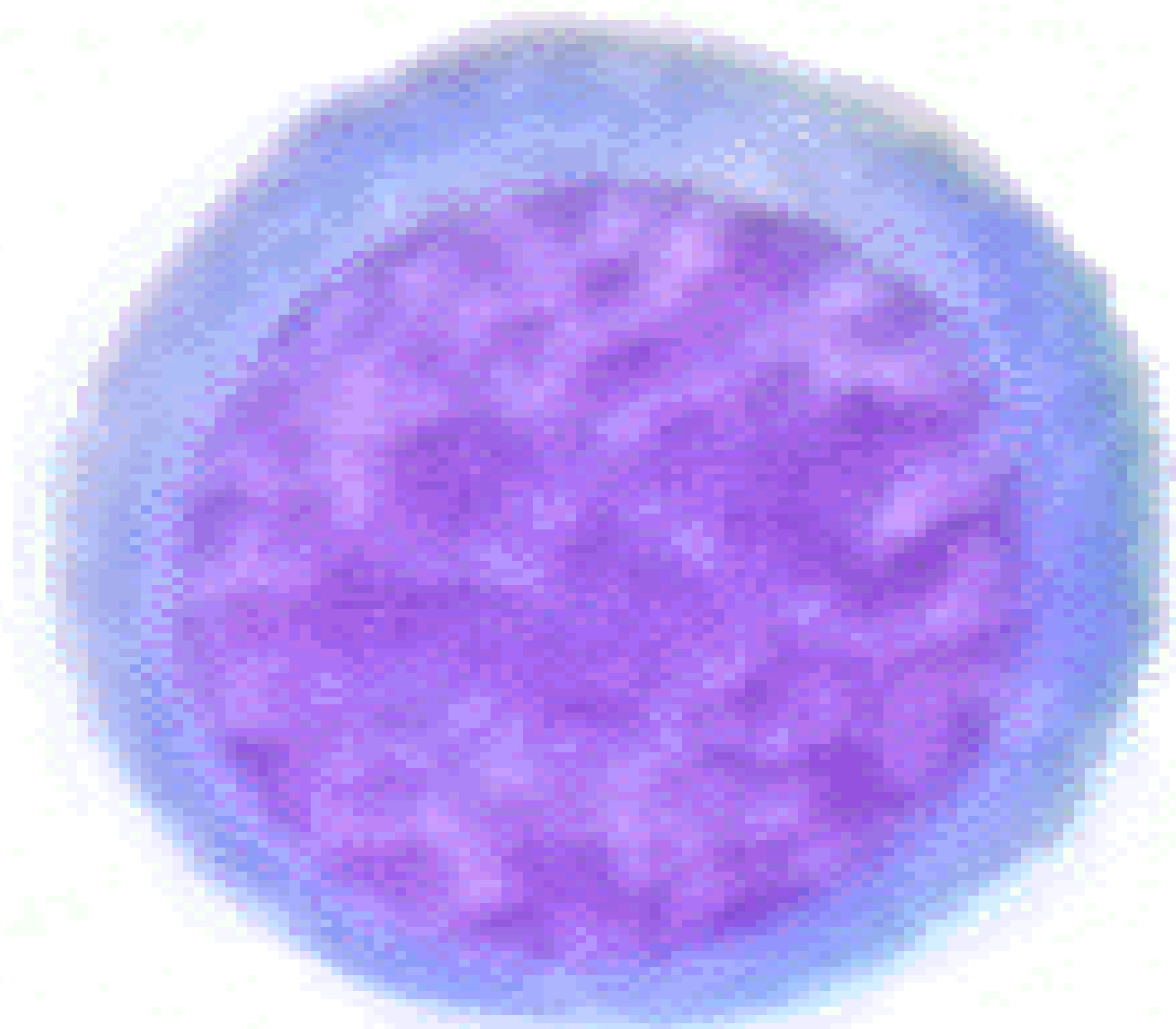


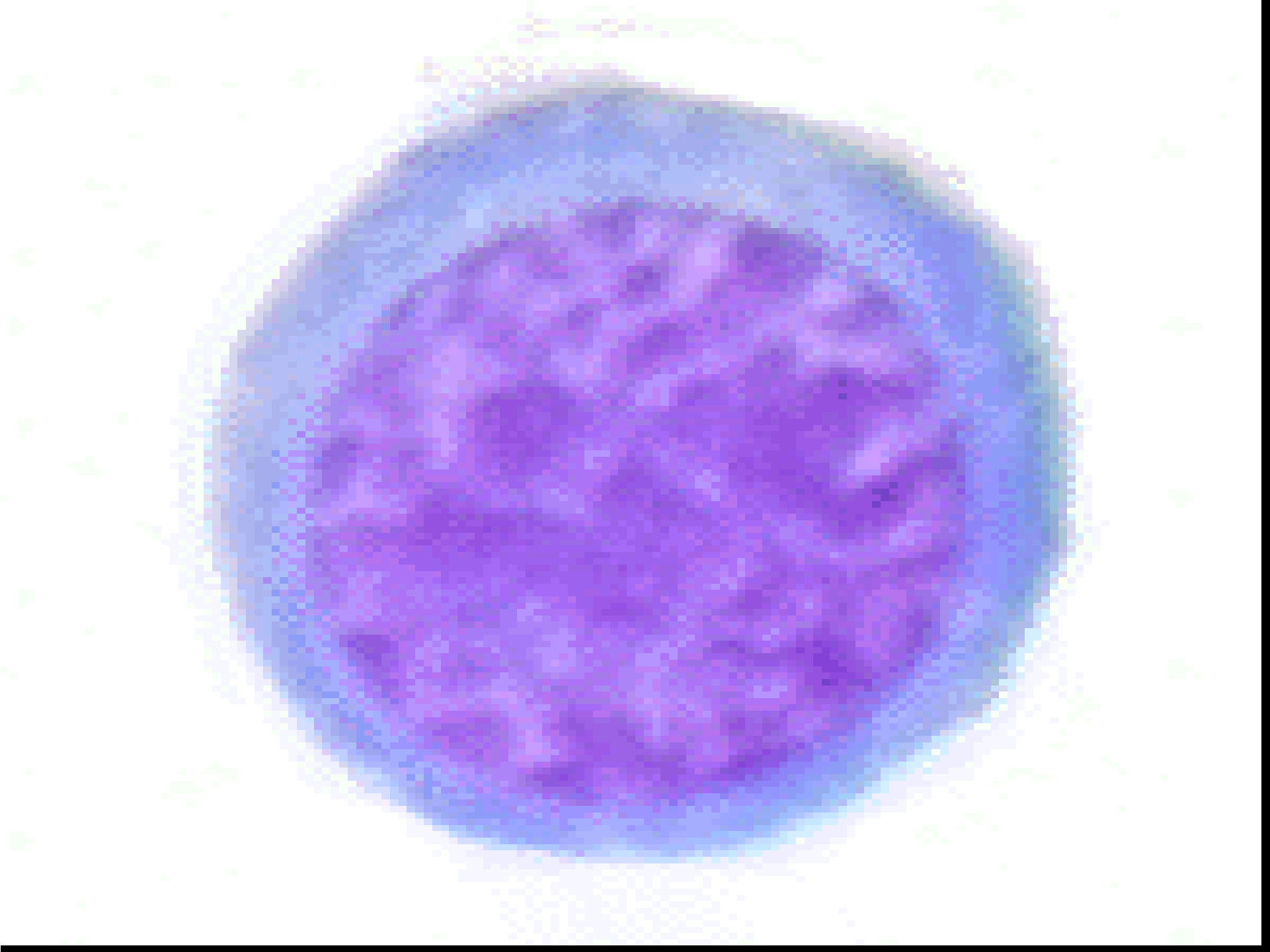




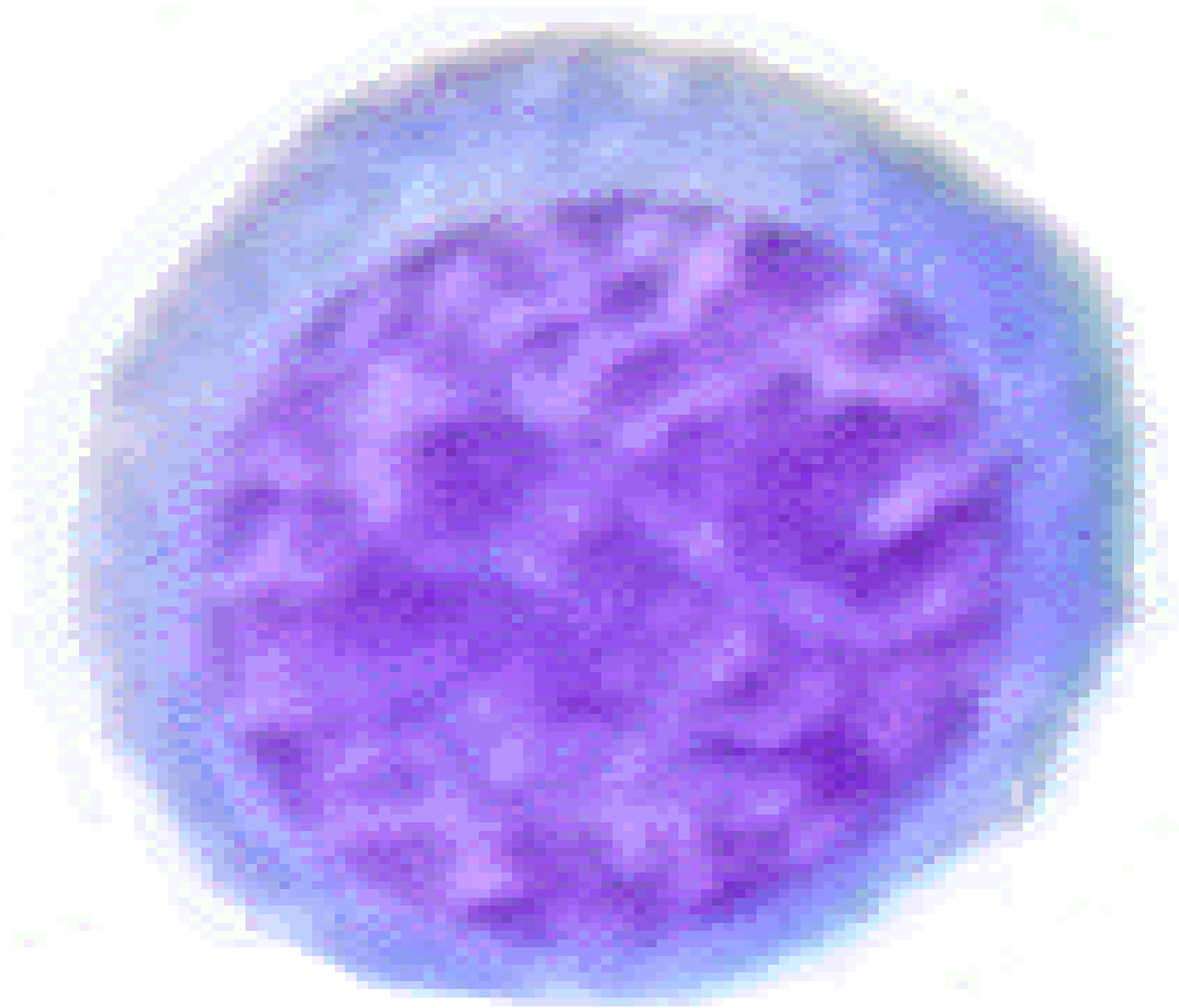


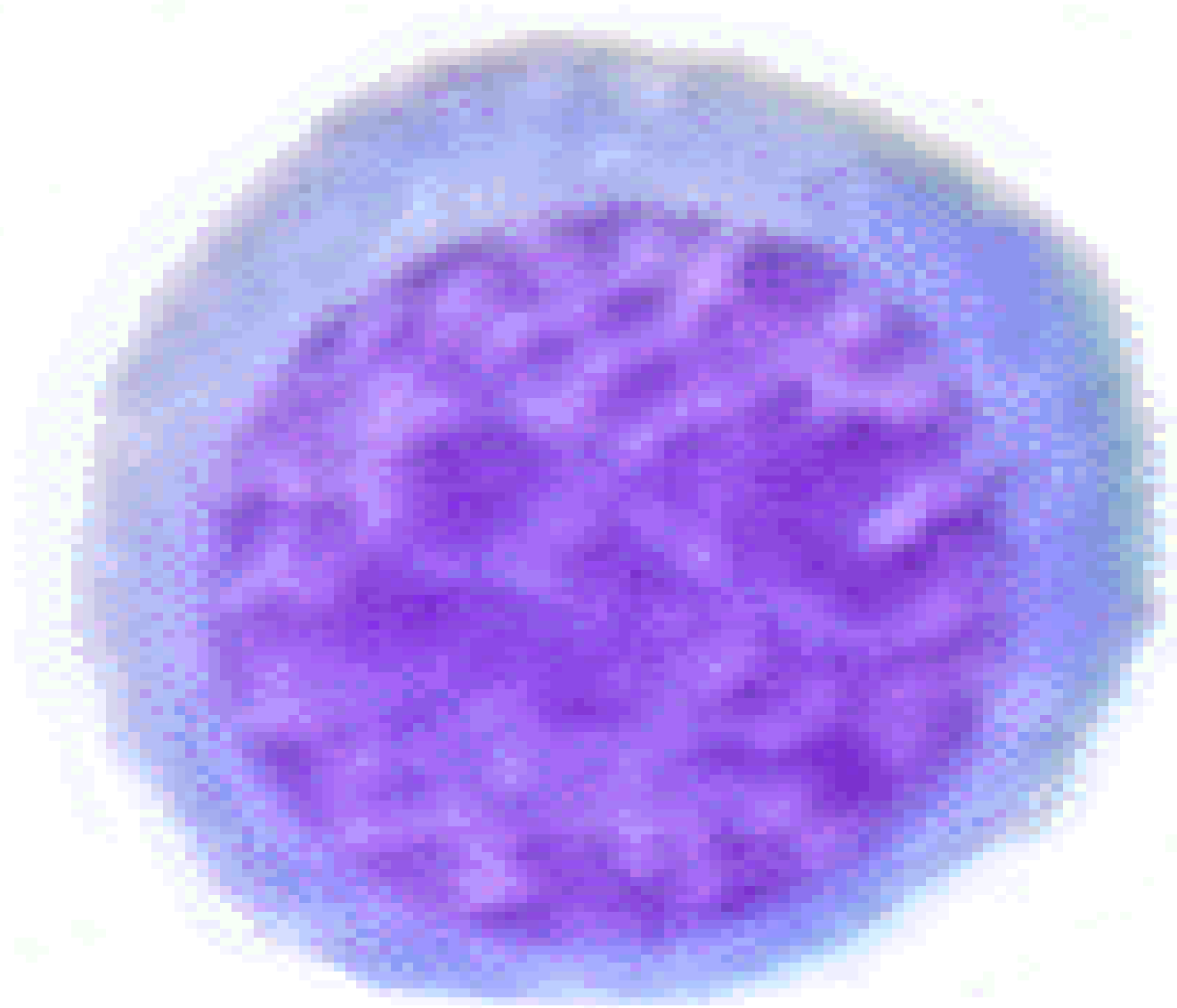


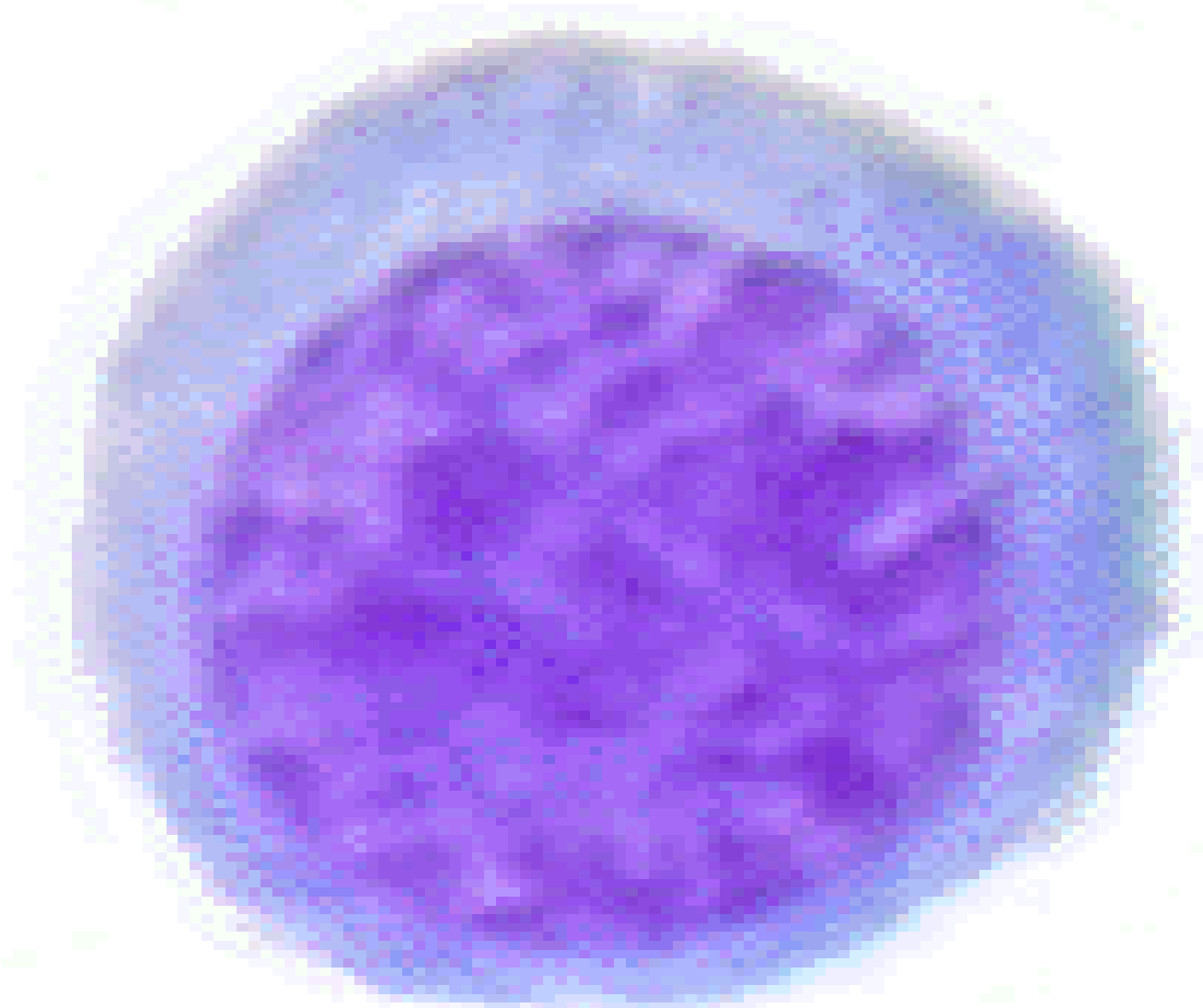


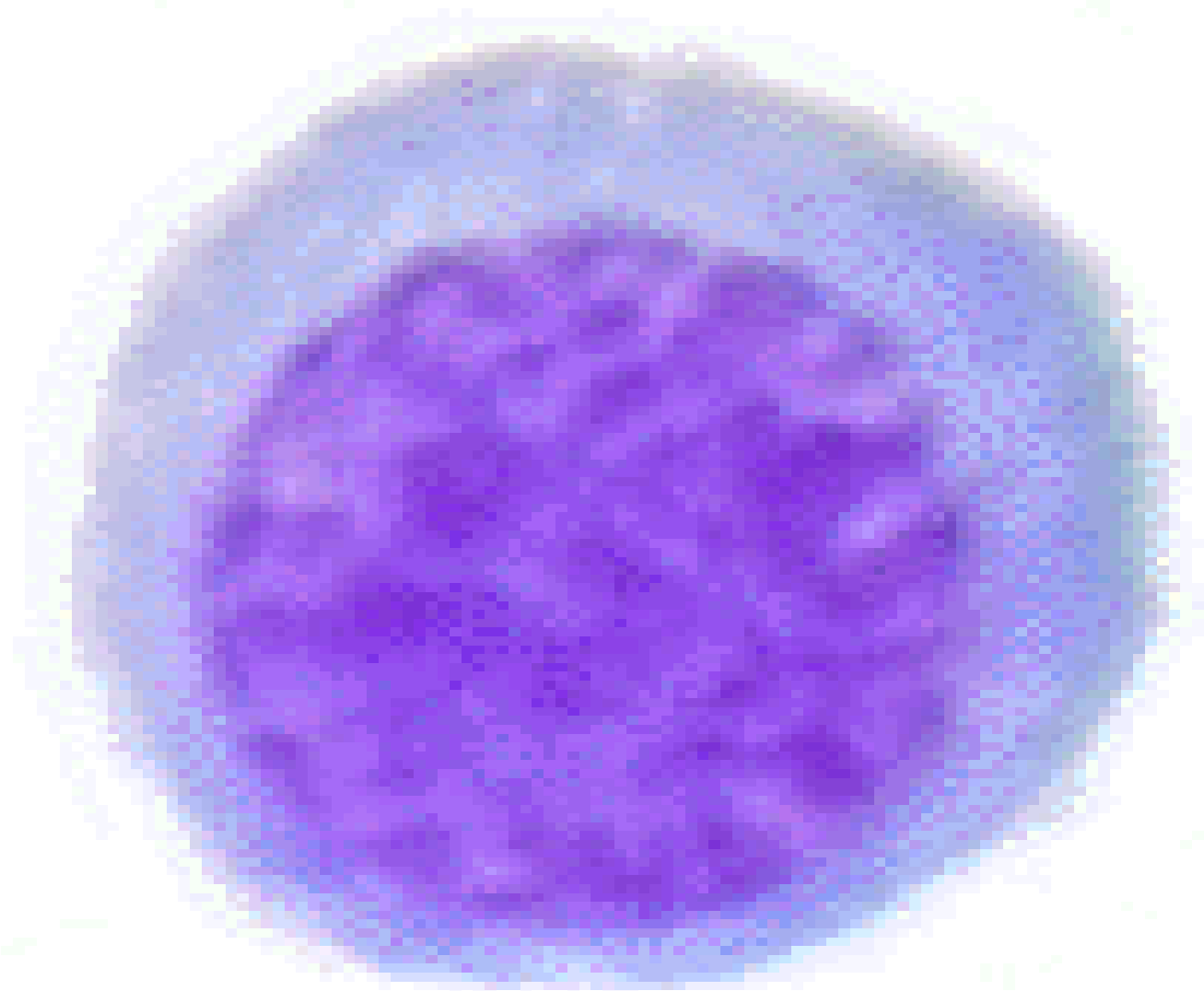


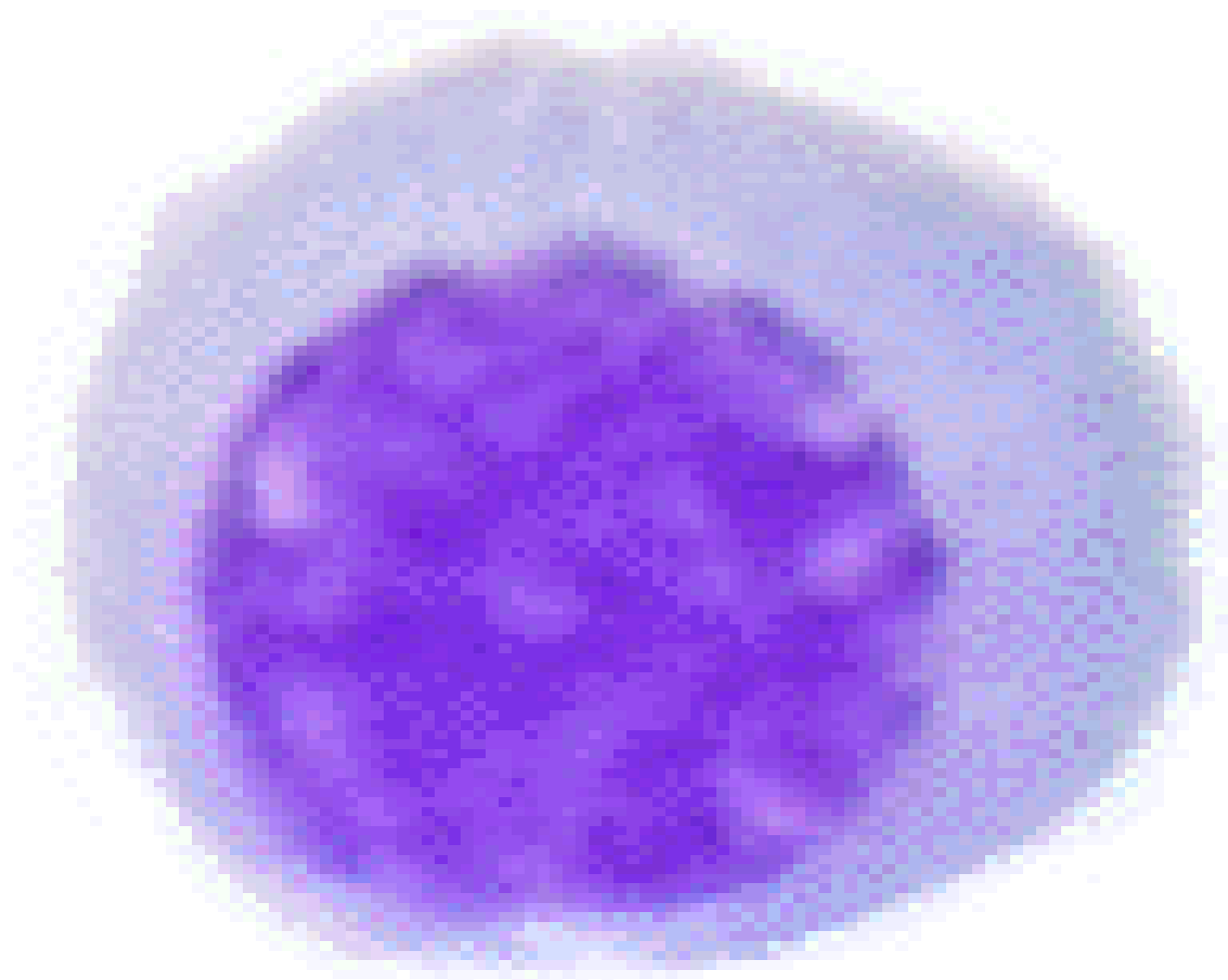


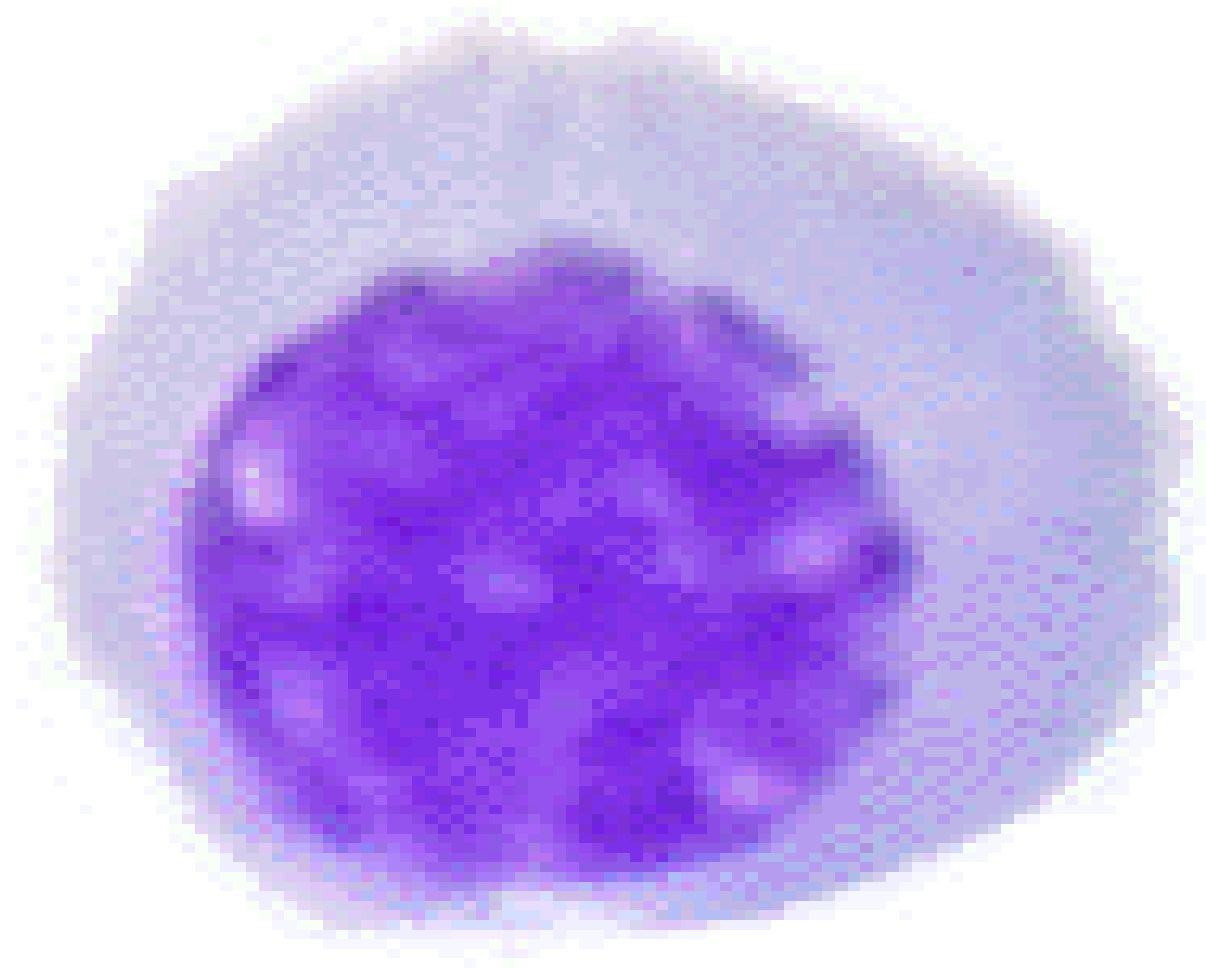


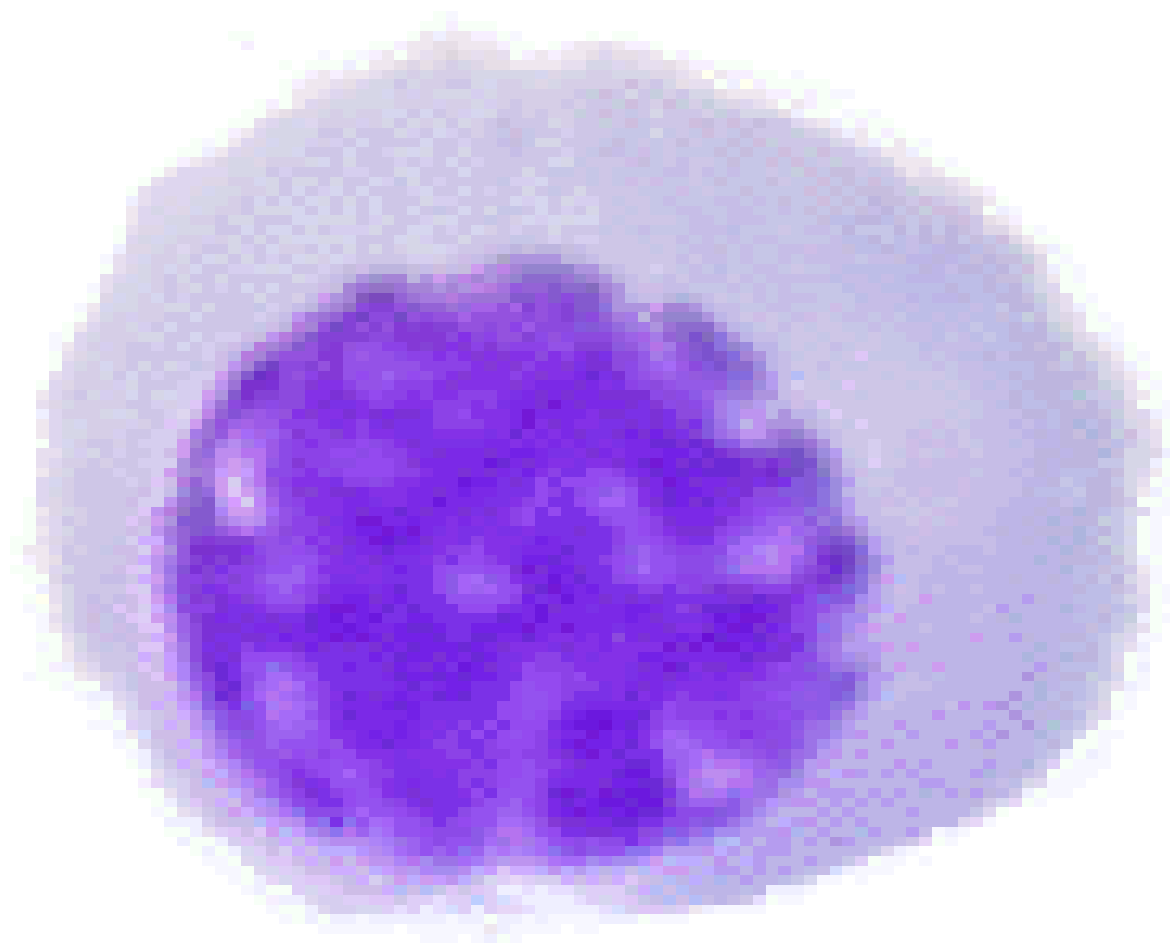


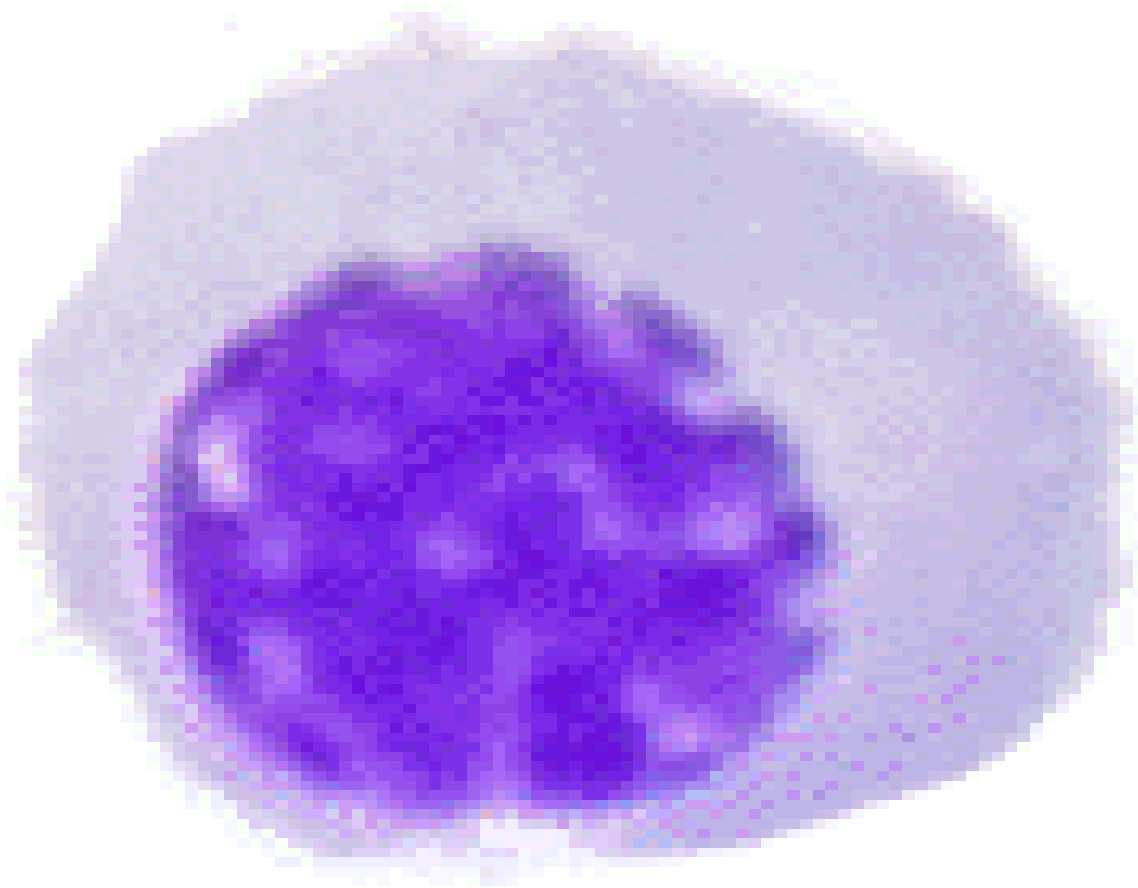


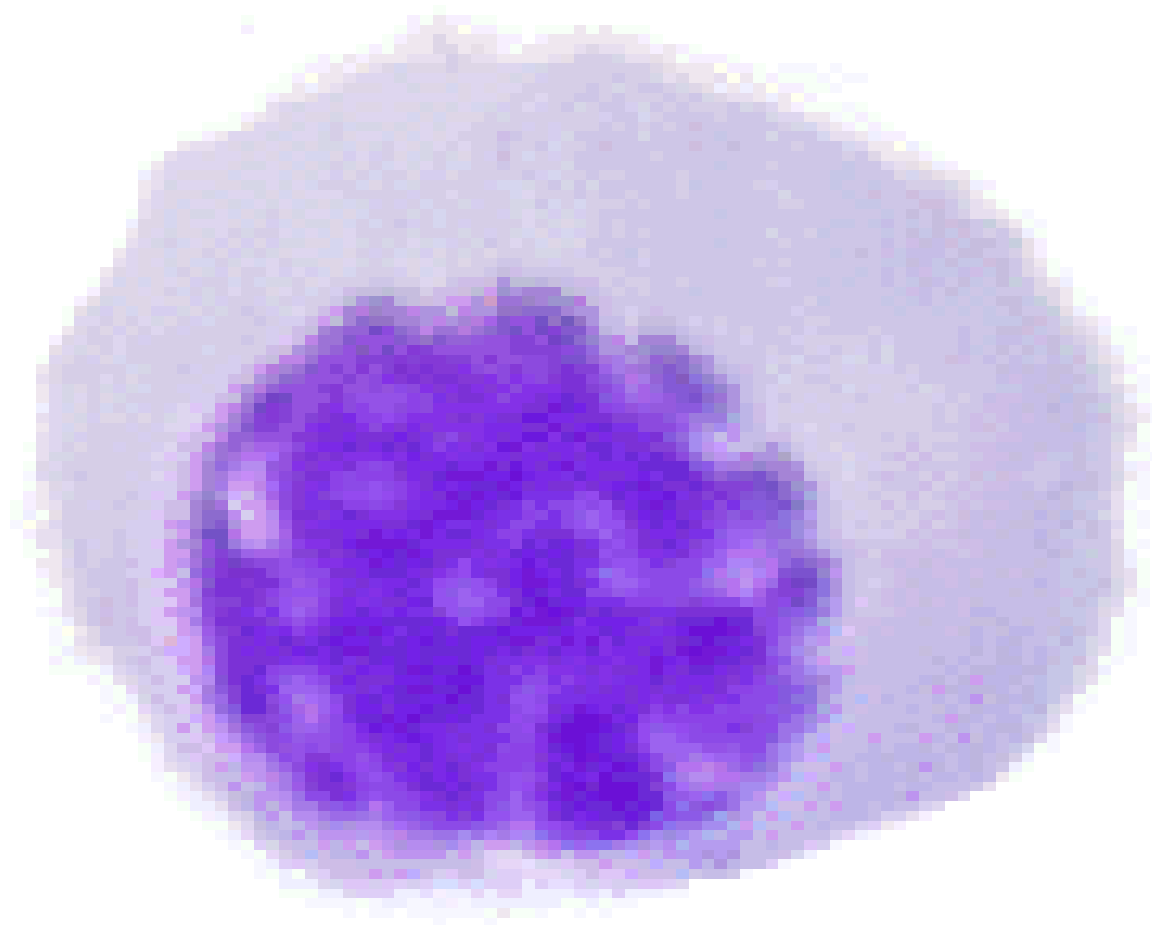


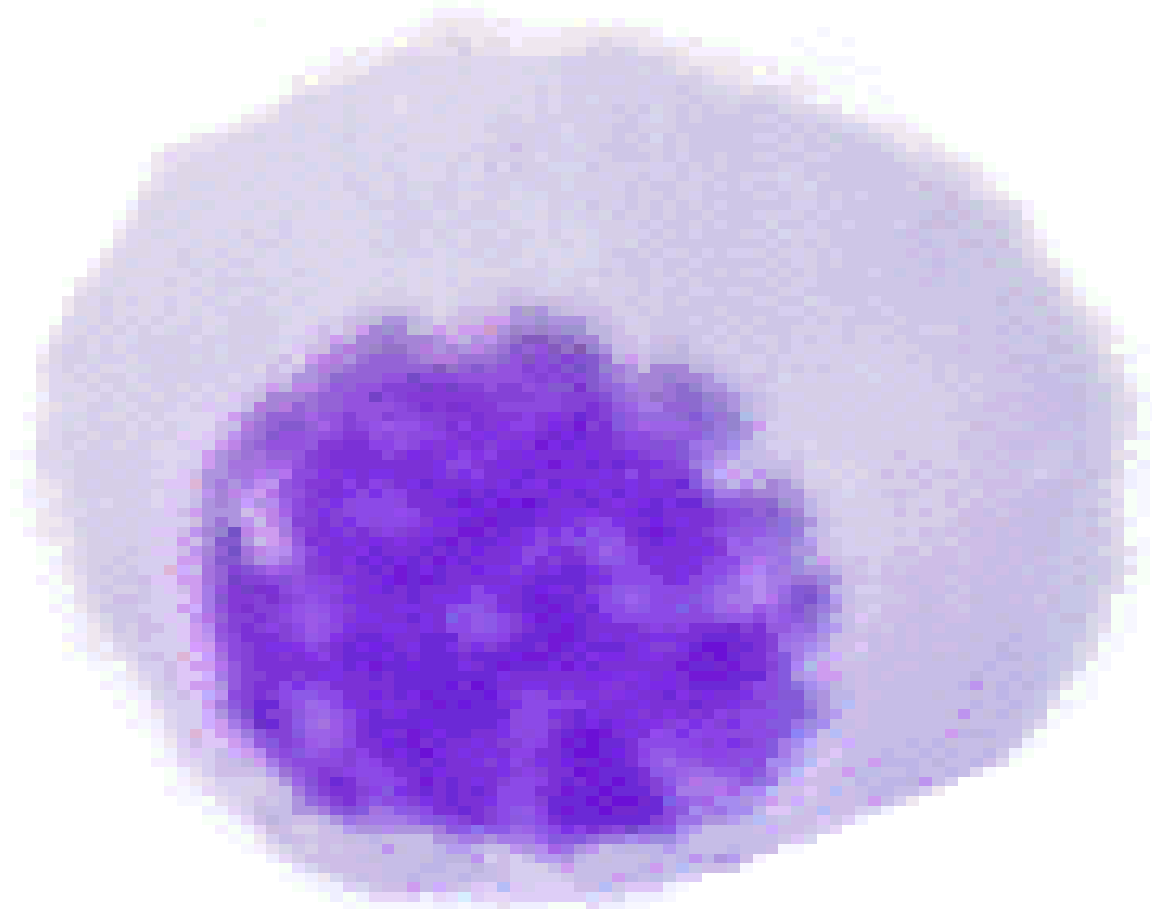


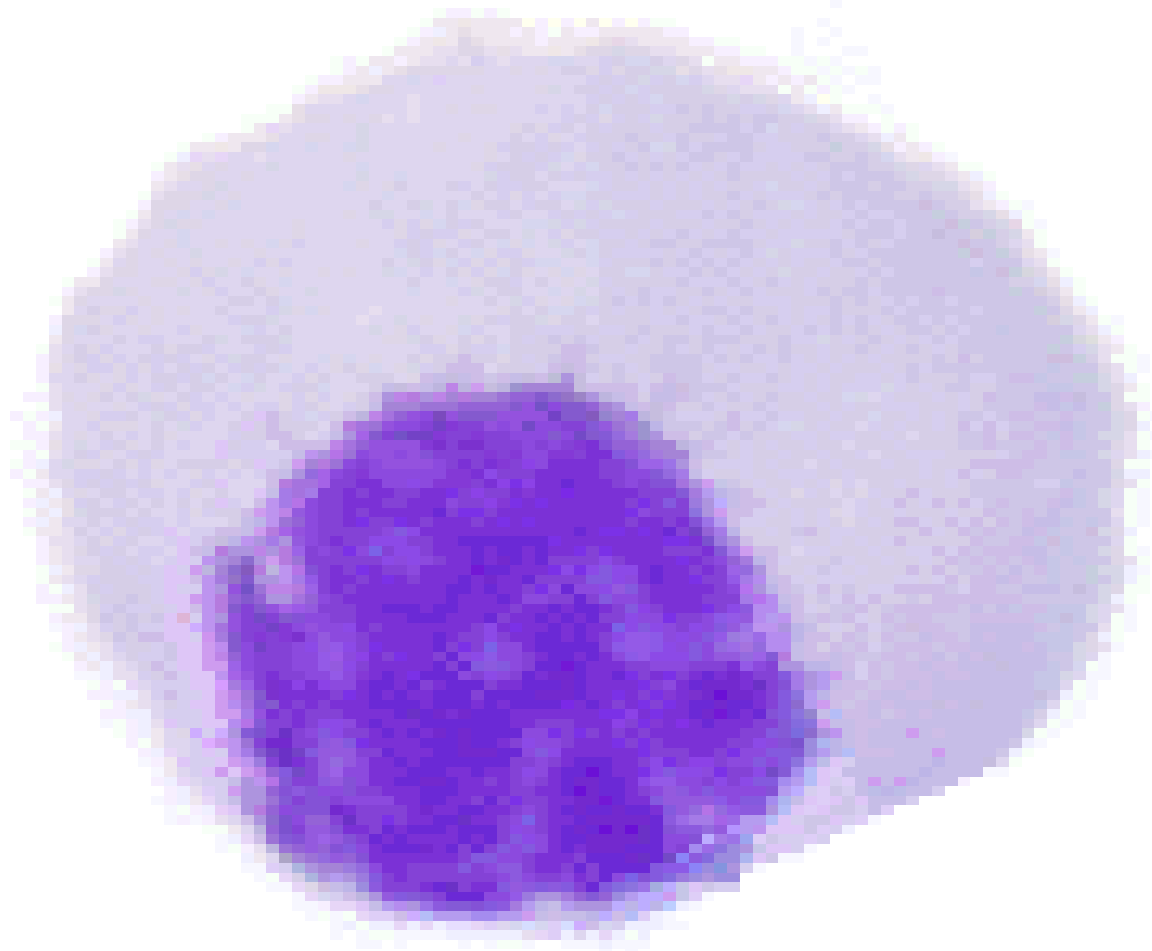


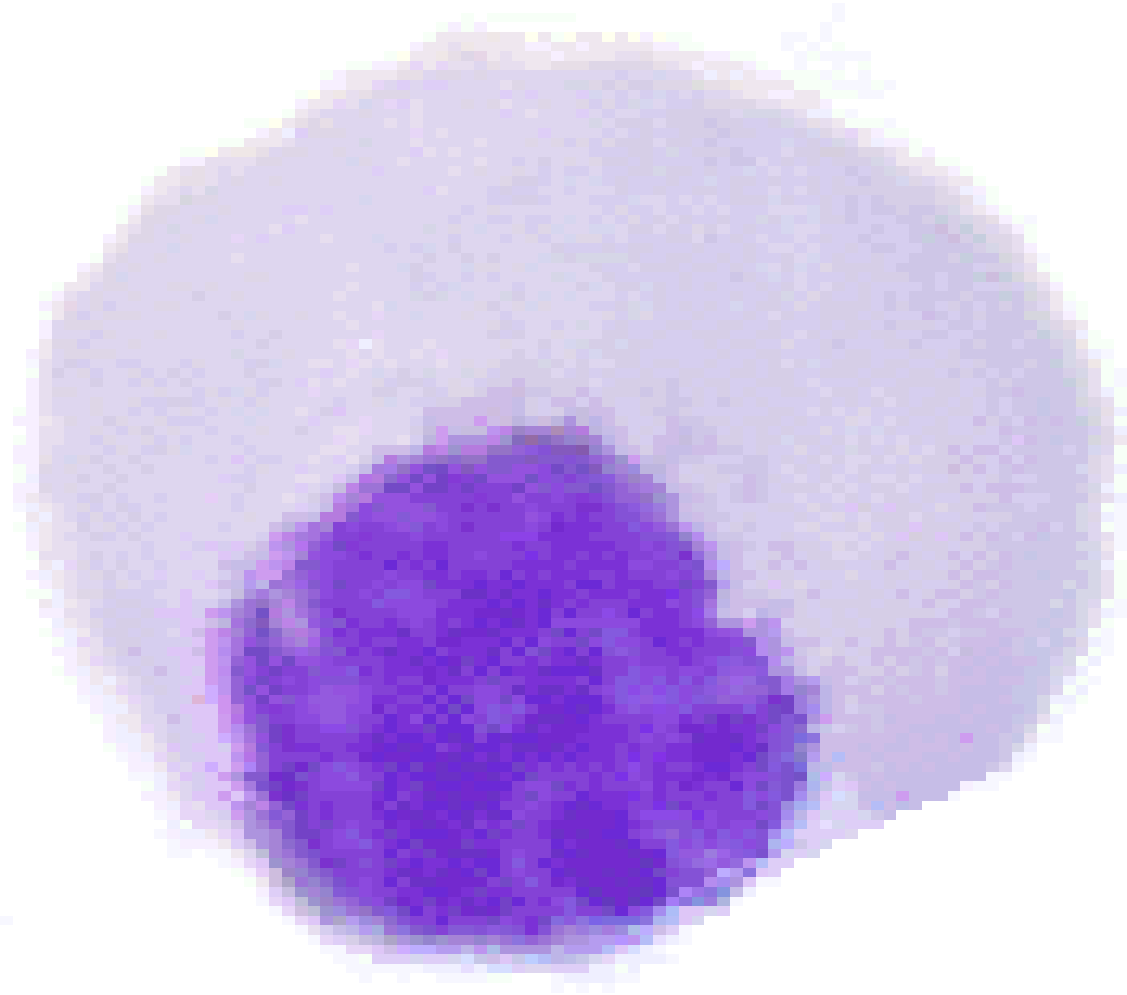


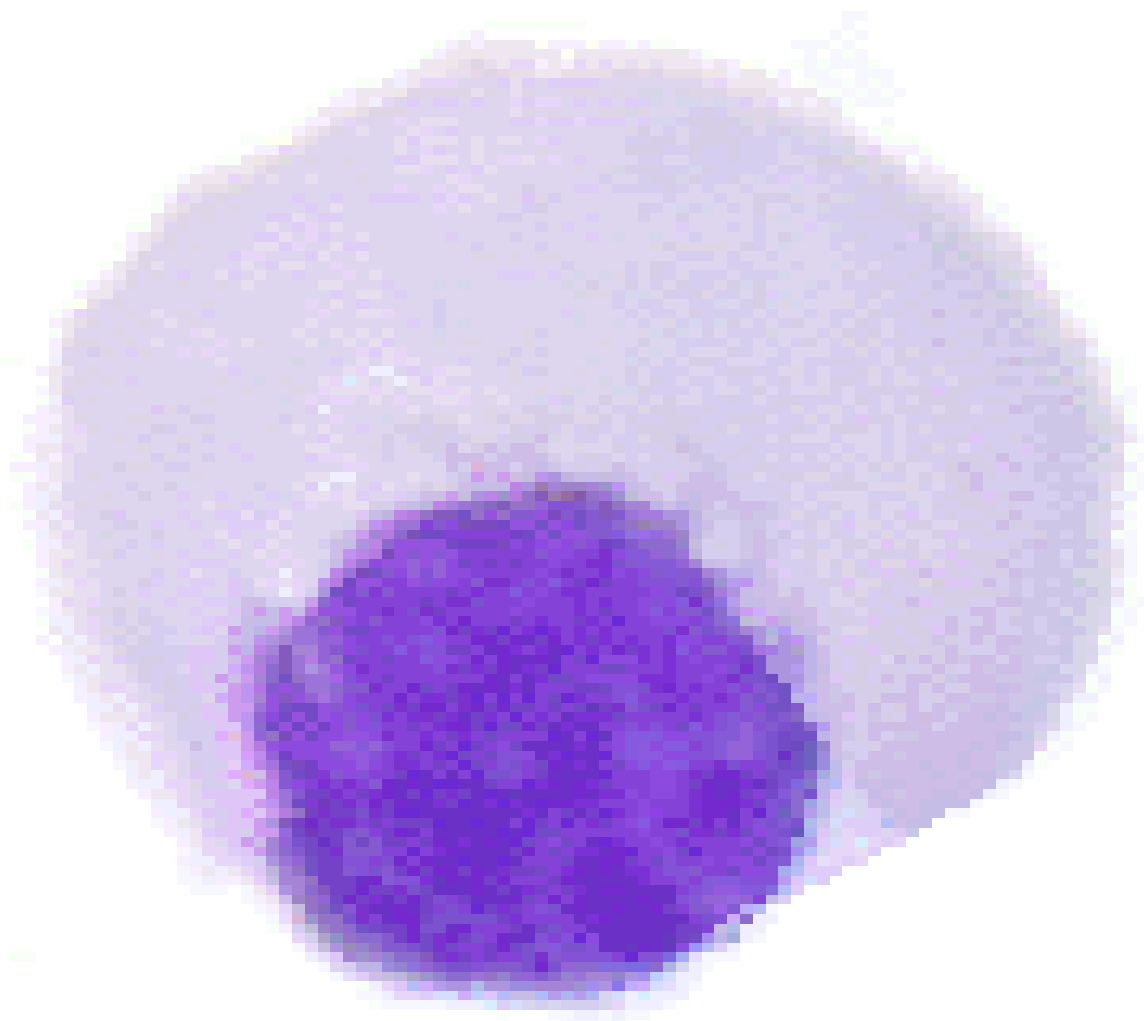


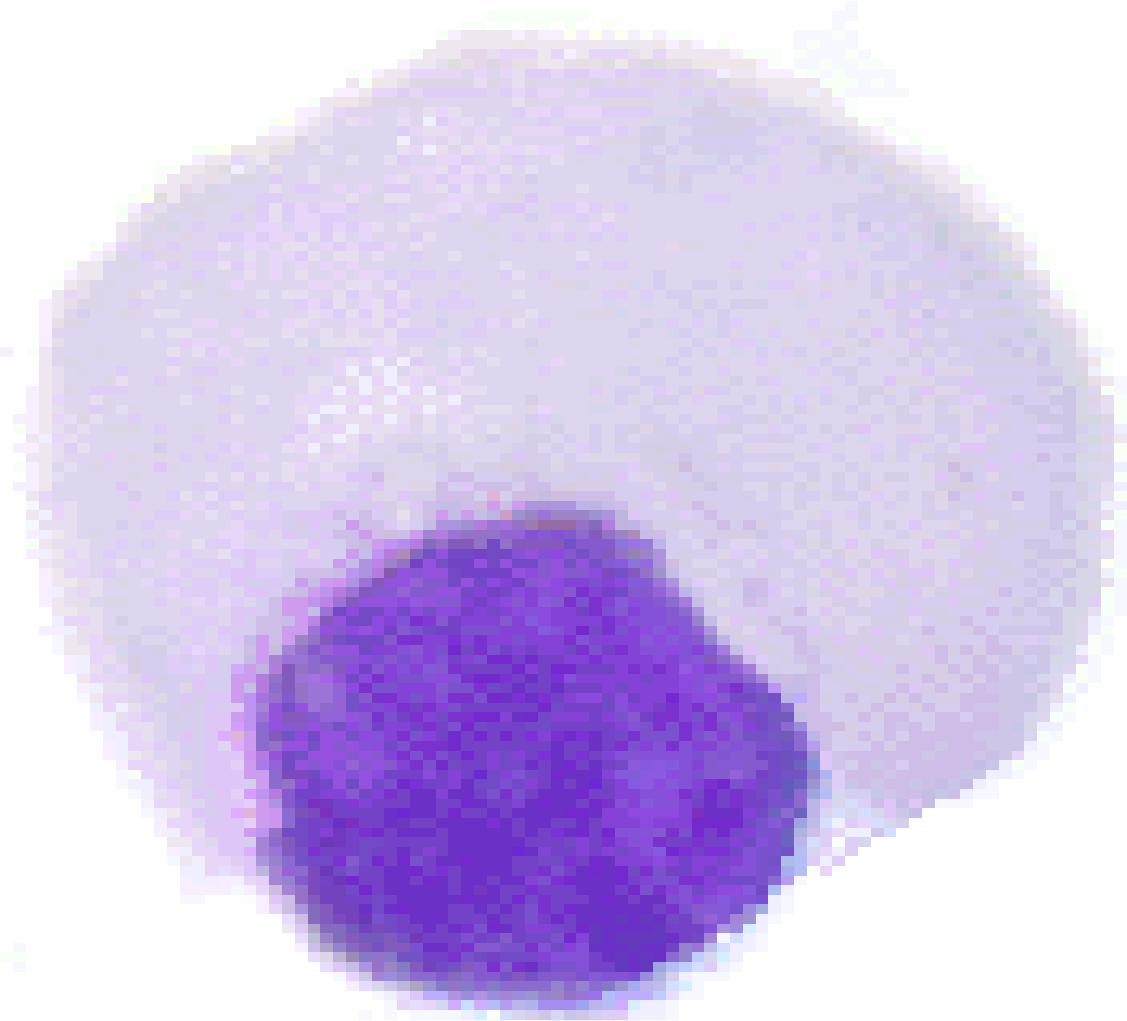


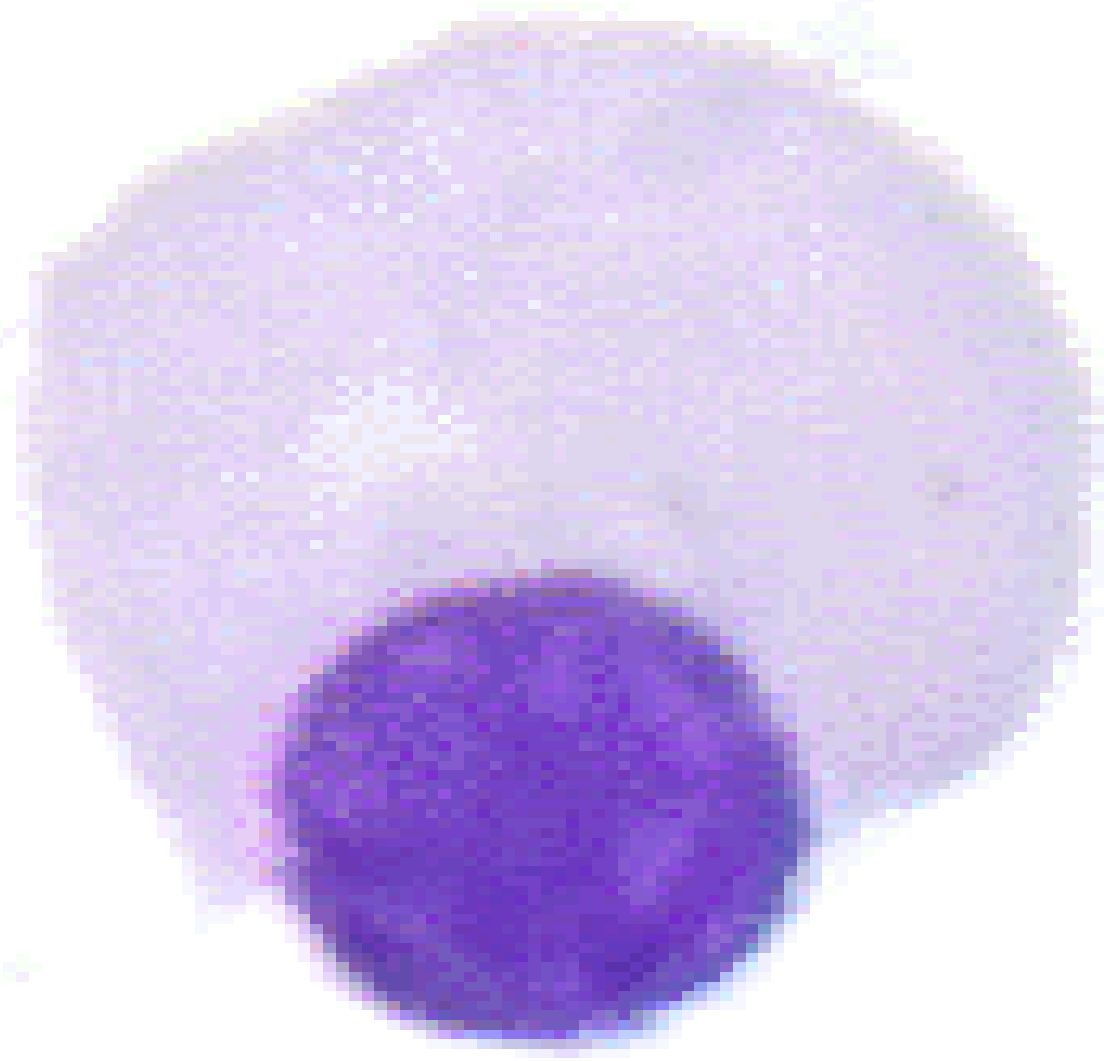


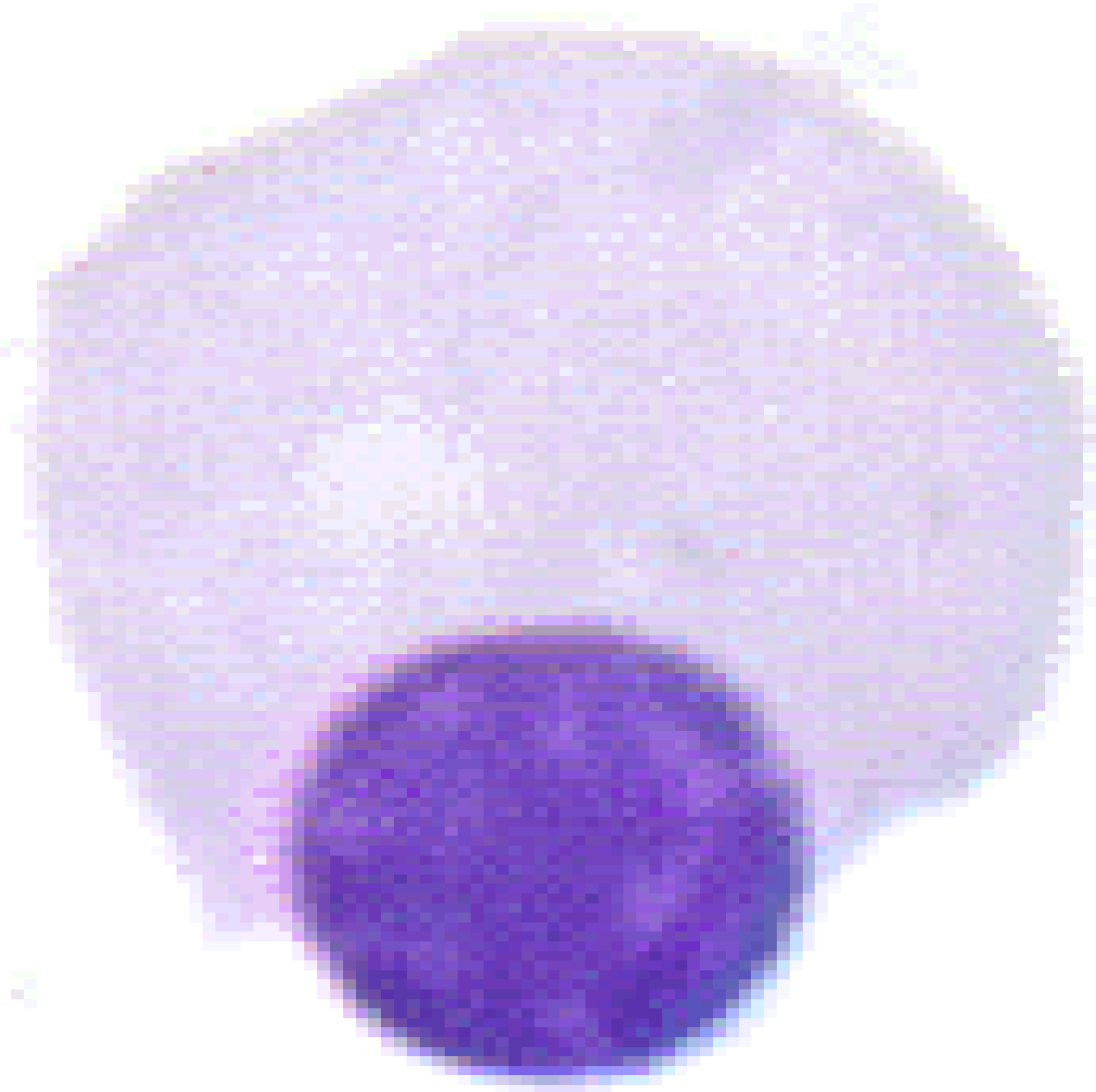


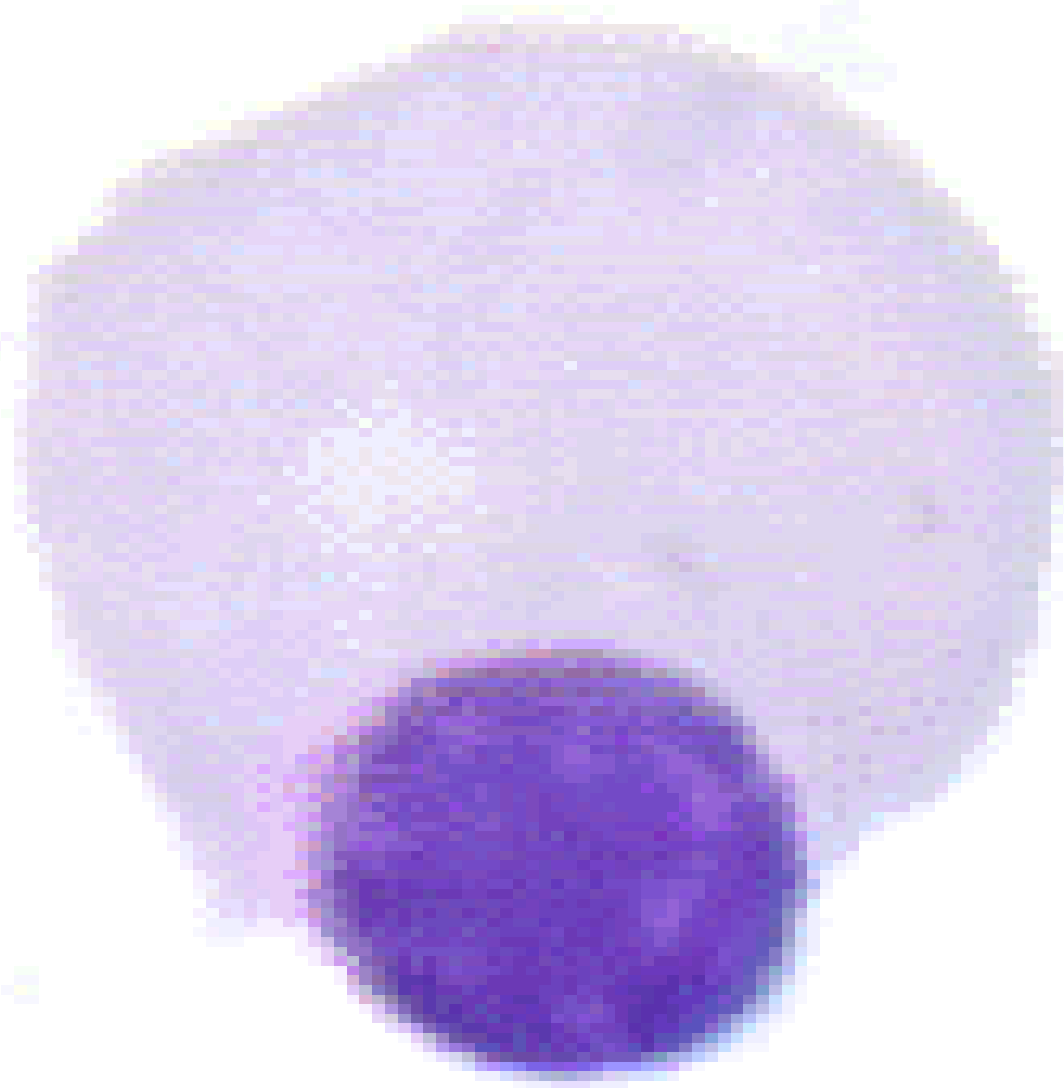


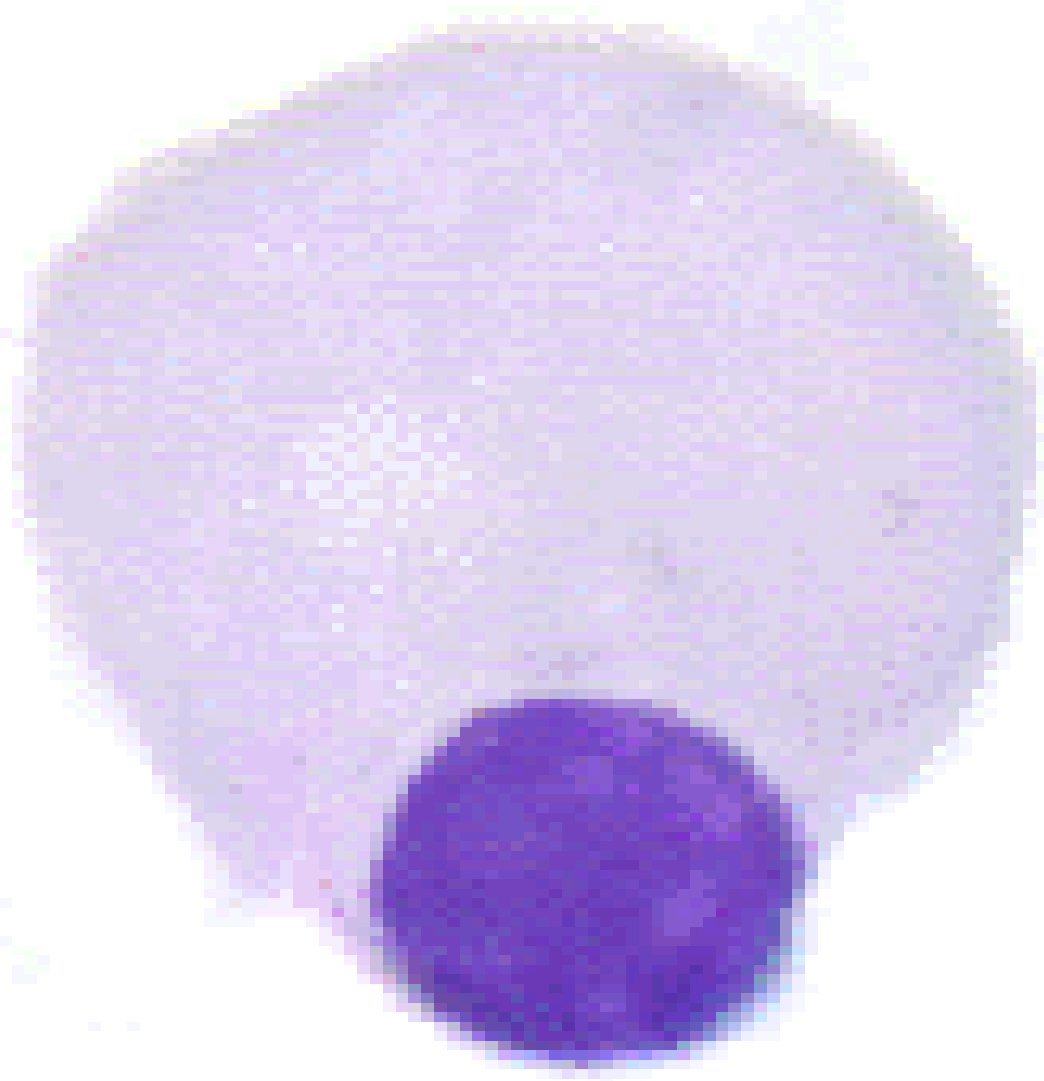












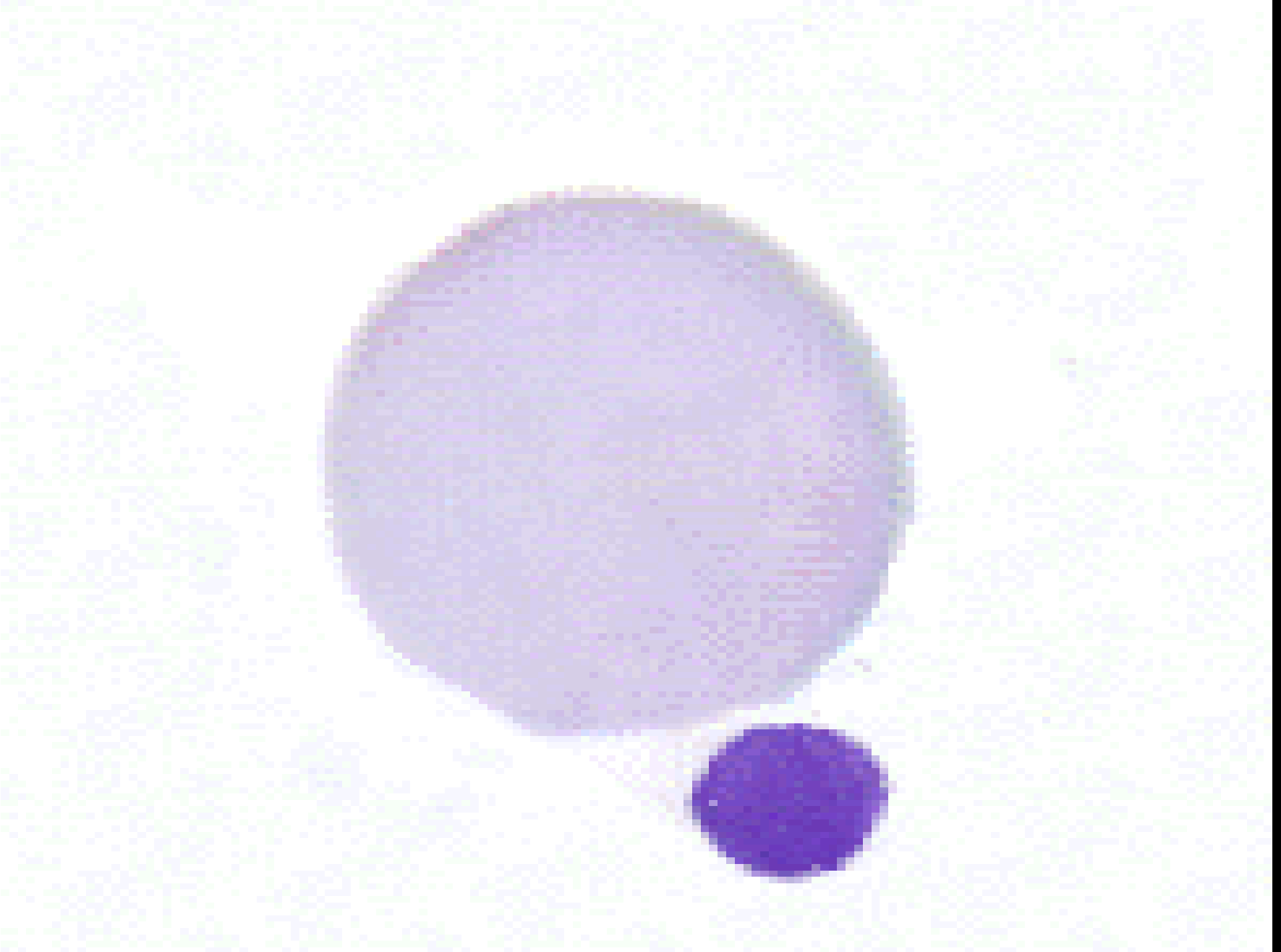




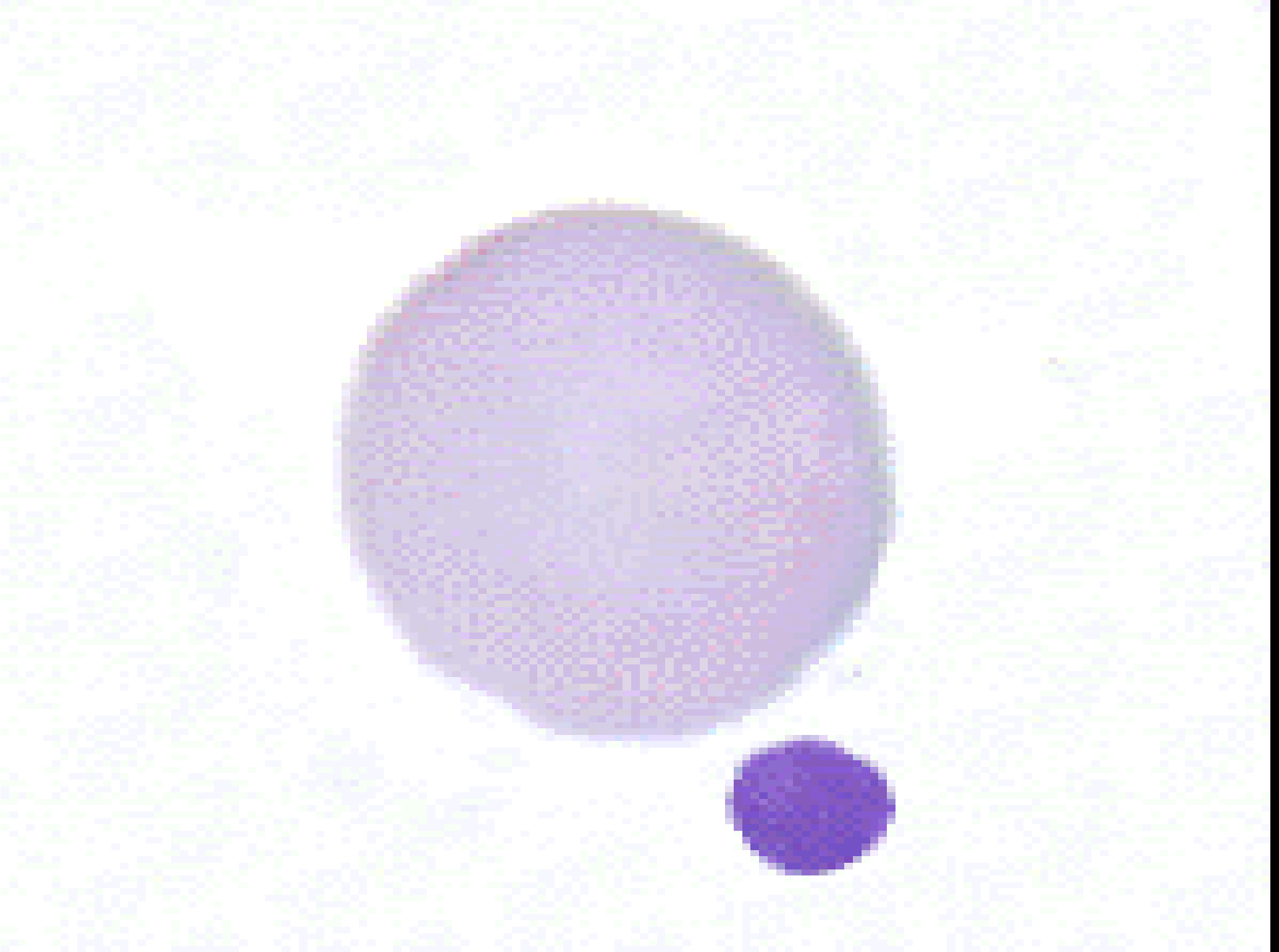


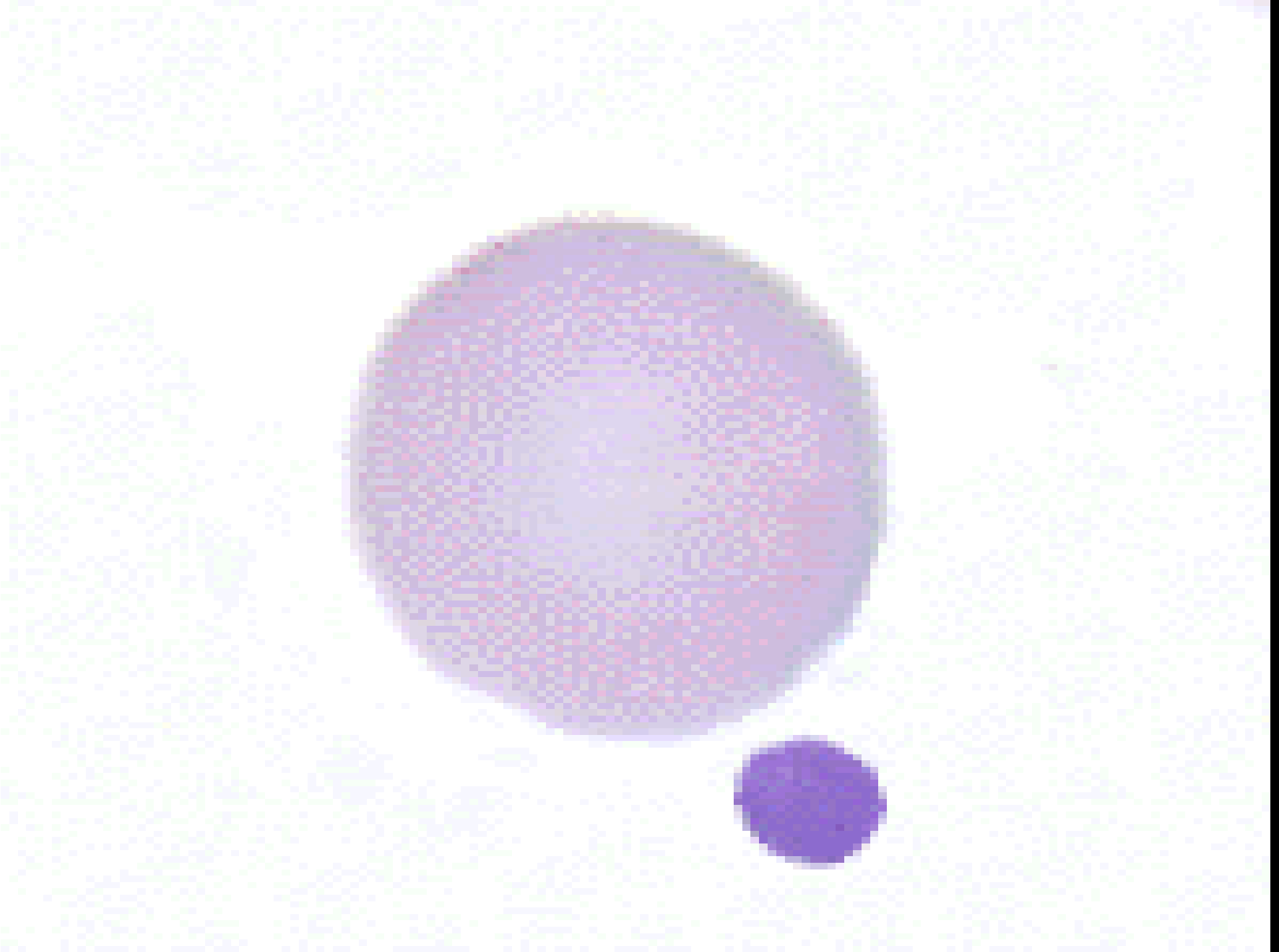




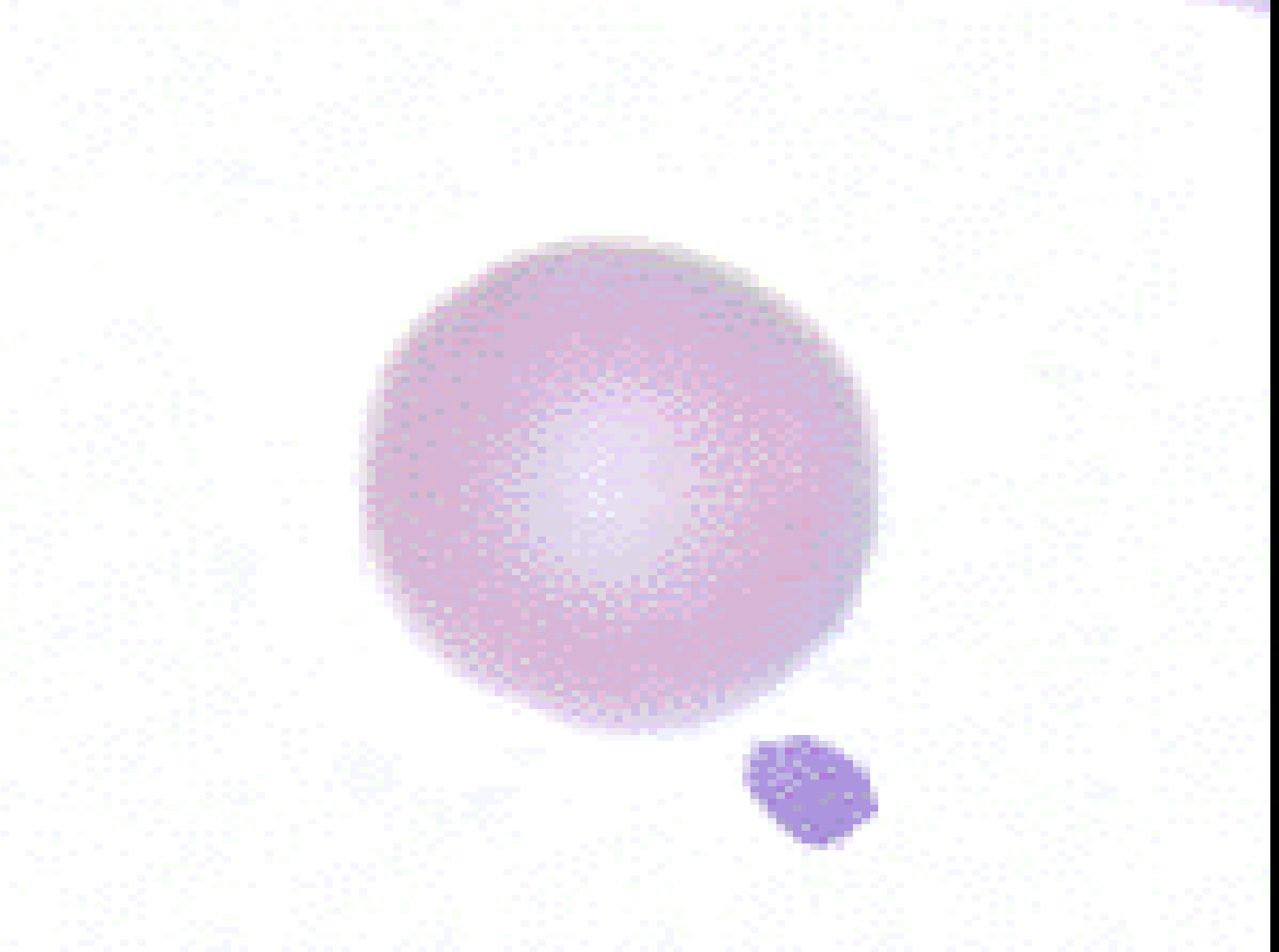




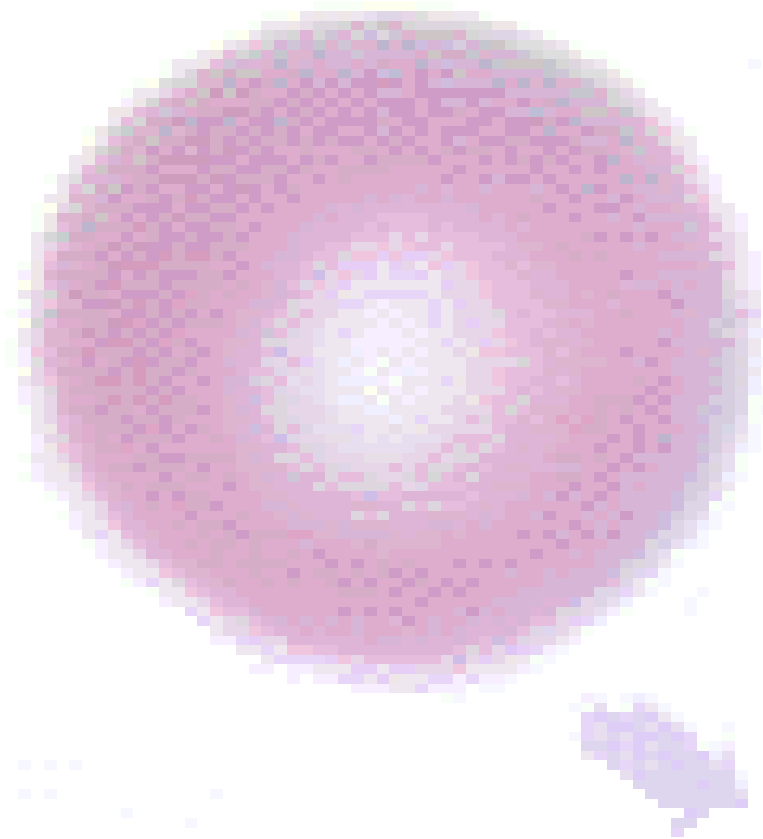


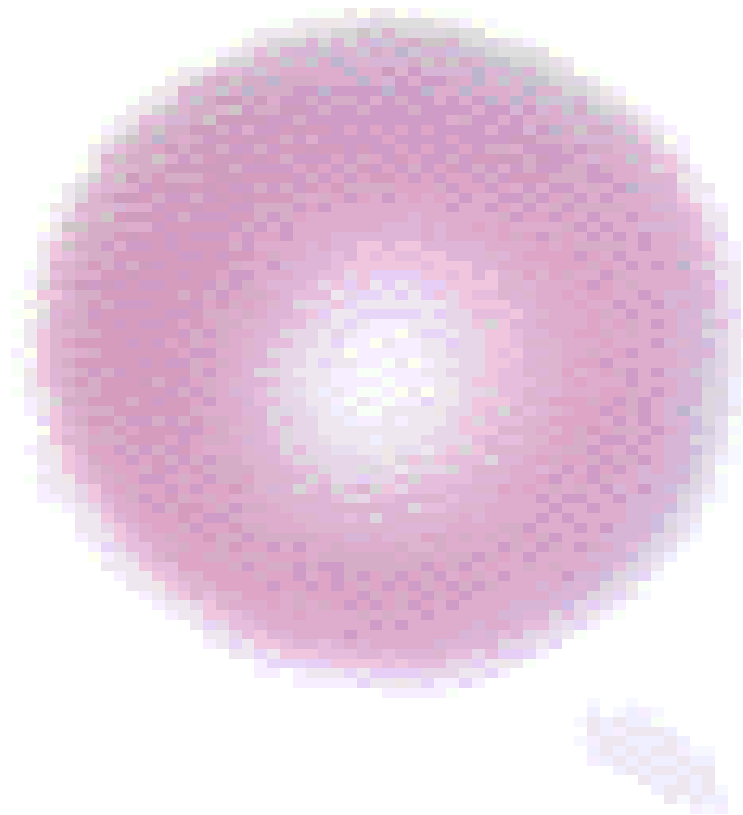


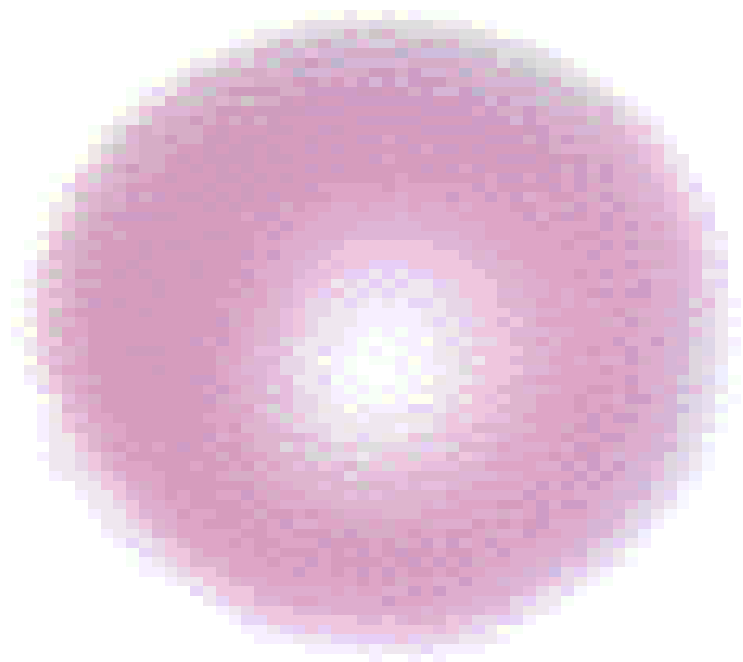


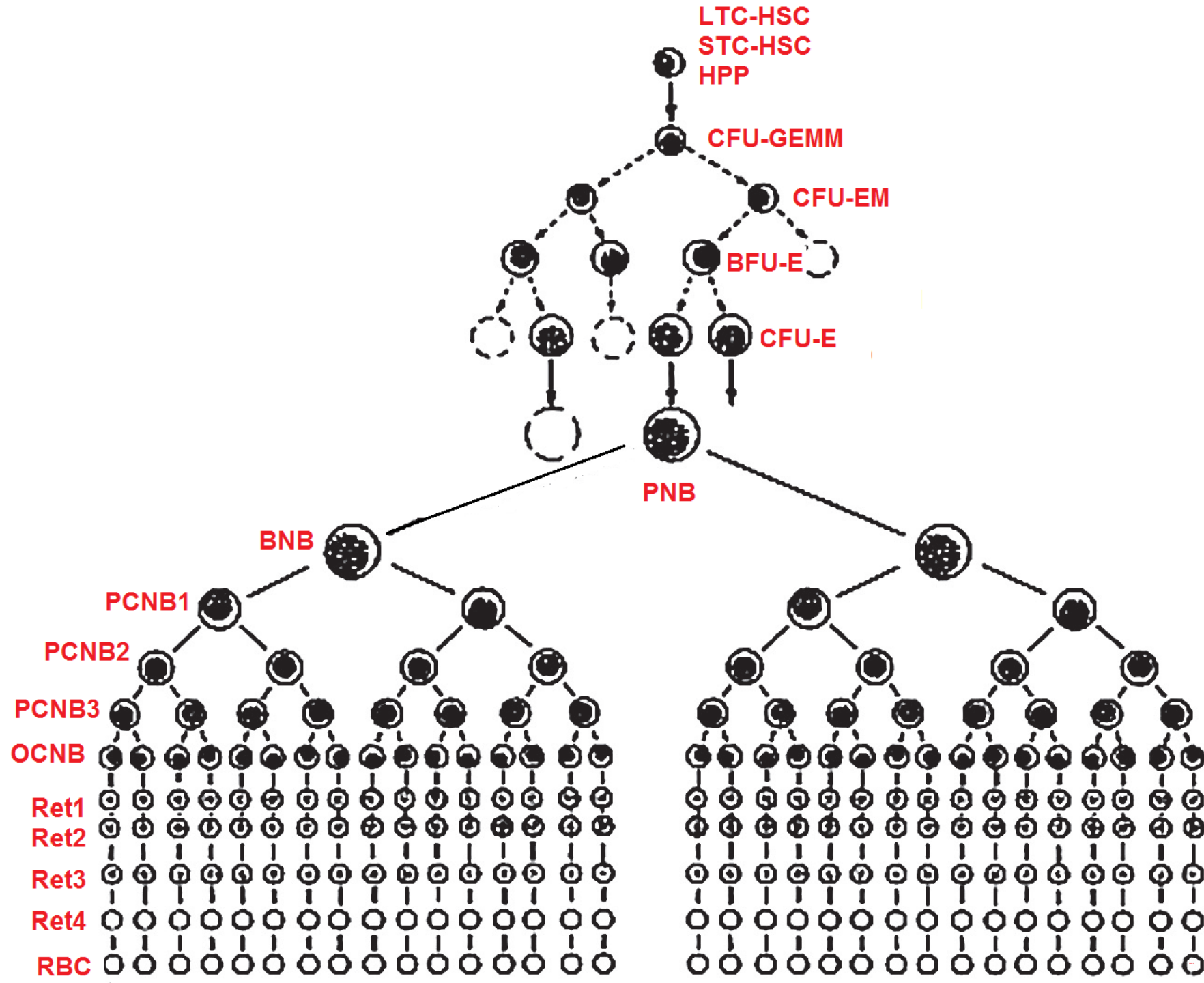


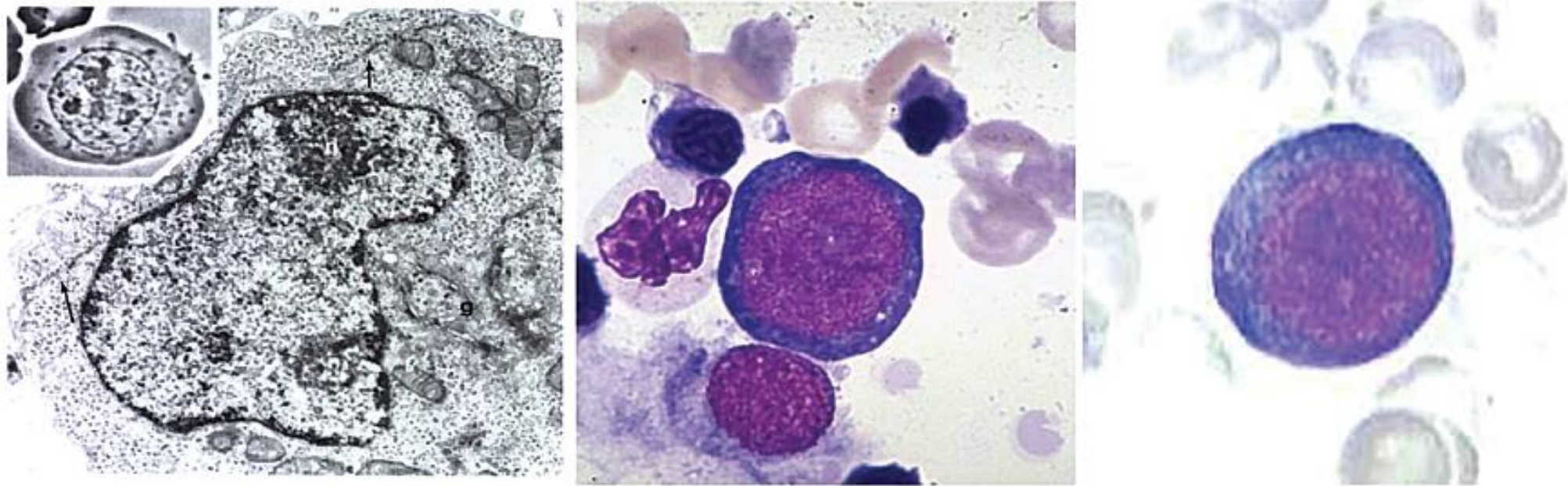




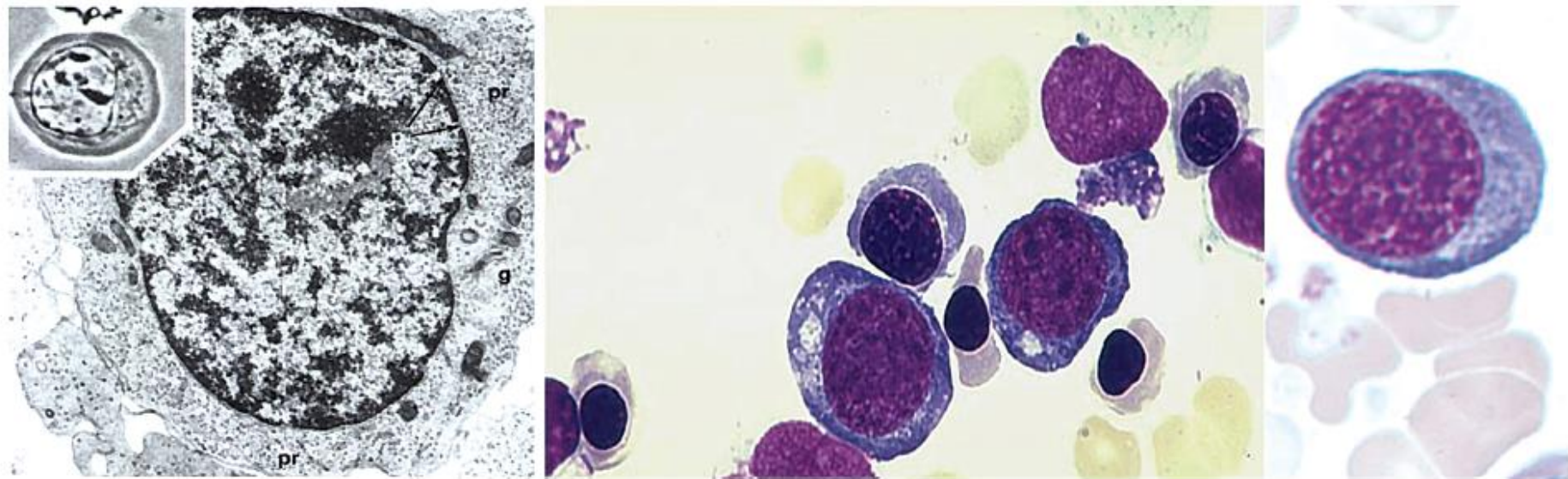




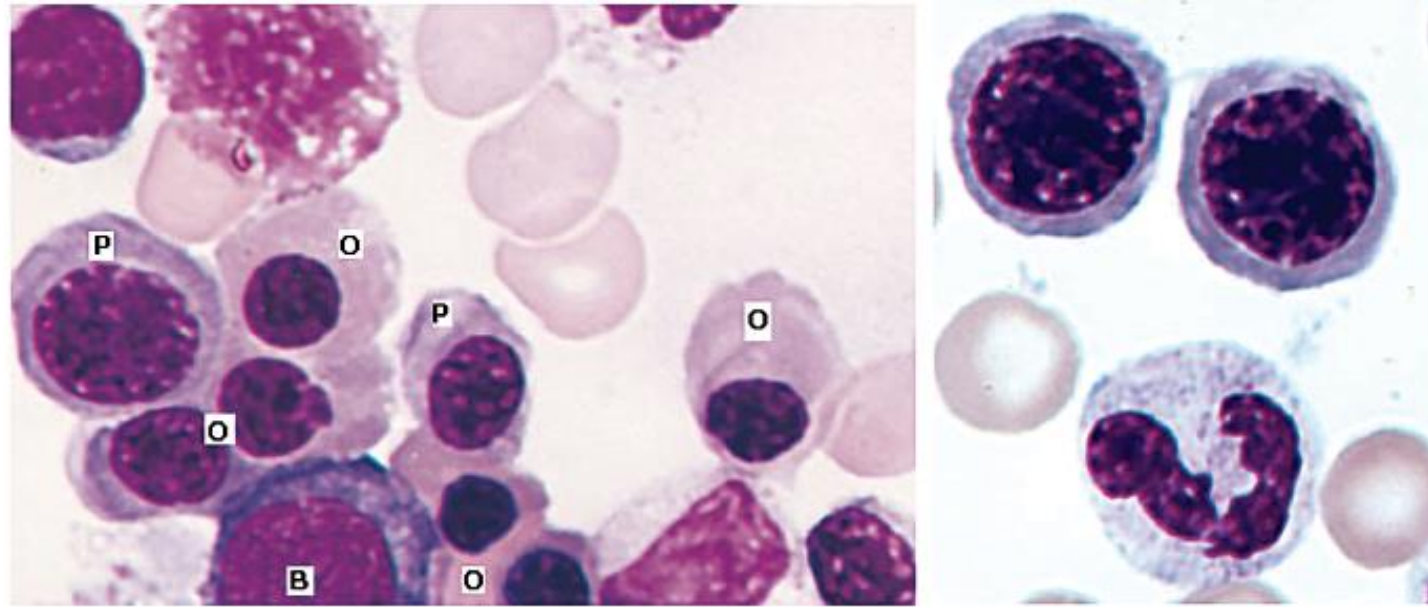




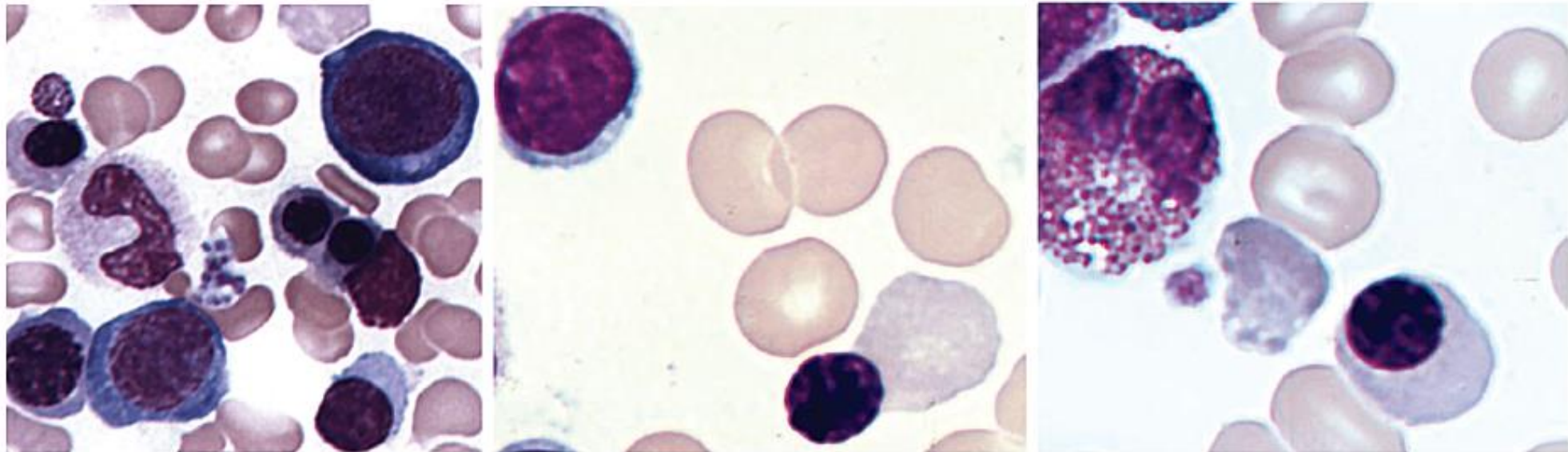
شکل ۴-۲۷: (راست و وسط) تصویر دو نورموبلاست بزرگ با کروماتین باز و ظریف، (چپ): تصویر TEM الکترونی از شبکه اندوپلاسمی وسیع (فلش) و گلژی (g) در اطراف هسته پرونورموبلاست.



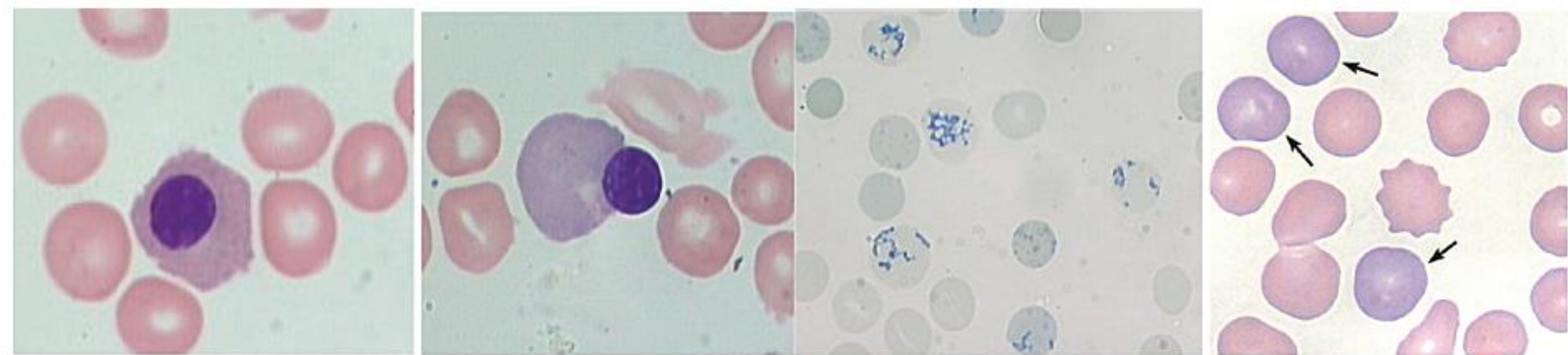
شکل ۵-۲۷: (تصویر راست و وسط): تصویر سه بازوفیلیک نورموبلاست در کنار دو PCN و سه OCN. تصویر سمت چپ: تصویر TEM از سوراخ‌های هسته (P)، پلی‌ریبوزوم (Pr) و دستگاه گلژی (g) و کاهش شبکه اندوپلاسمی [۲۵].



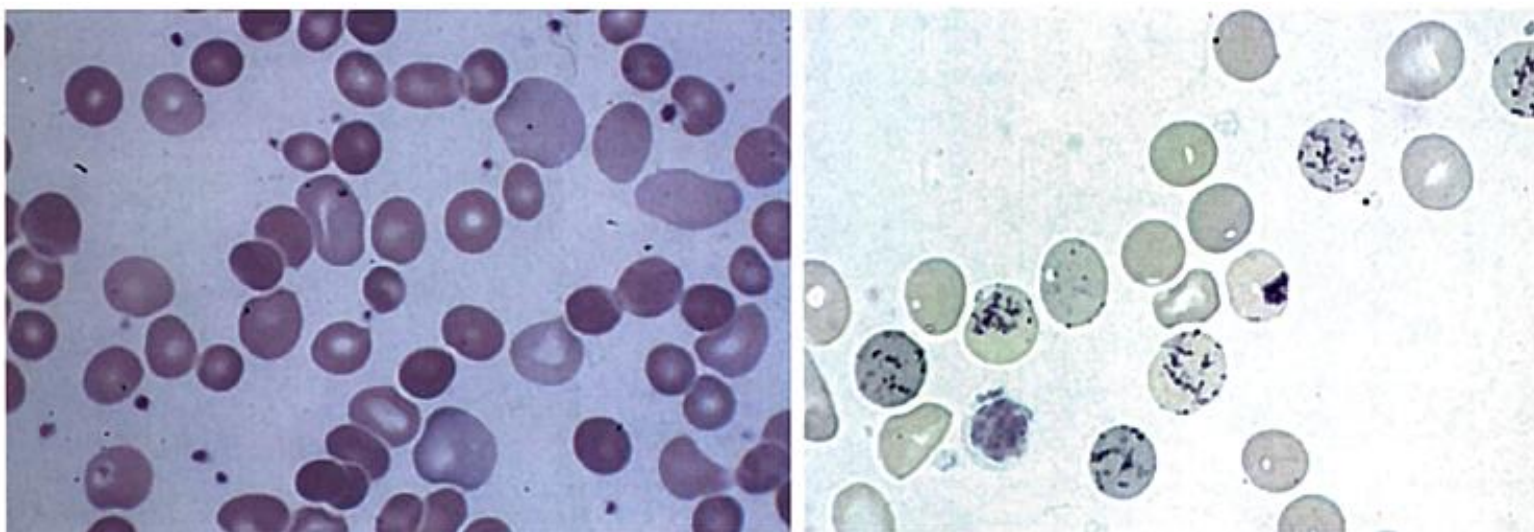
شکل ۶-۲۷: تصویر راست) دو پرونورموبلاست و یک متامیلوسیت نوتروفیلی، چپ)، یک بازوفیلیک نورموبلاست (B) و دو پلی کروماتوفیلیک نورموبلاست (P) و ۶ اورتوکروماتوفیلیک نورموبلاست.



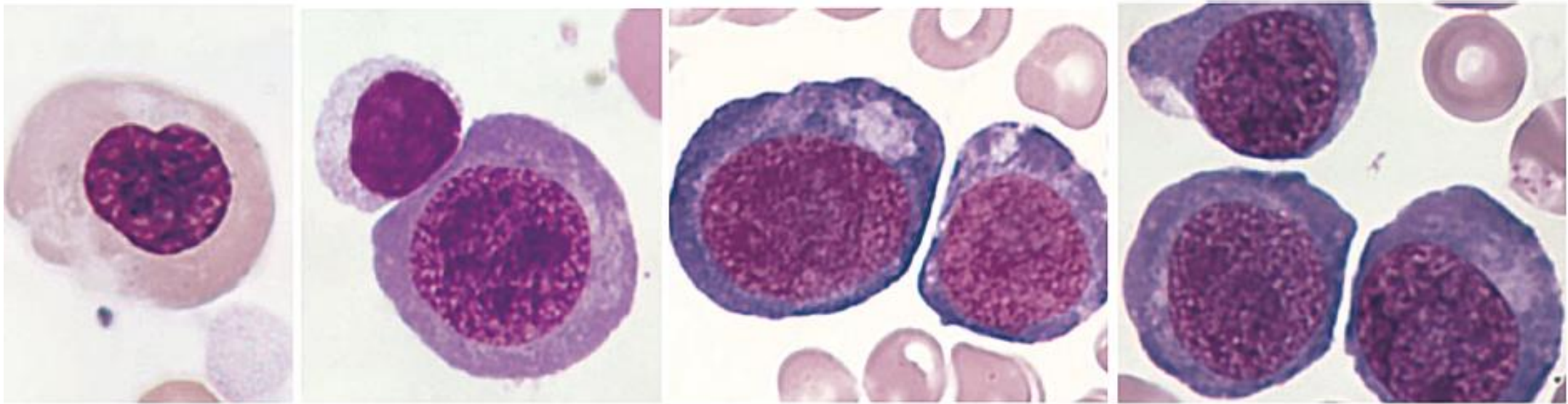
شکل ۷-۲۷: تصویر راست) یک اورتوکروماتیک نورموبلاست و یک انوزینوفیل، تصویر وسط) یک اورتوکروماتیک نورموبلاست در حال خارج کردن هسته و تصویر چپ) یک پرونورموبلاست، یک بازوفیلیک نورموبلاست، یک پلی کروماتوفیلیک نورموبلاست، سه اورتوکروماتیک نورموبلاست در کنار یک پلاسماسل و یک متامیلوسیت.



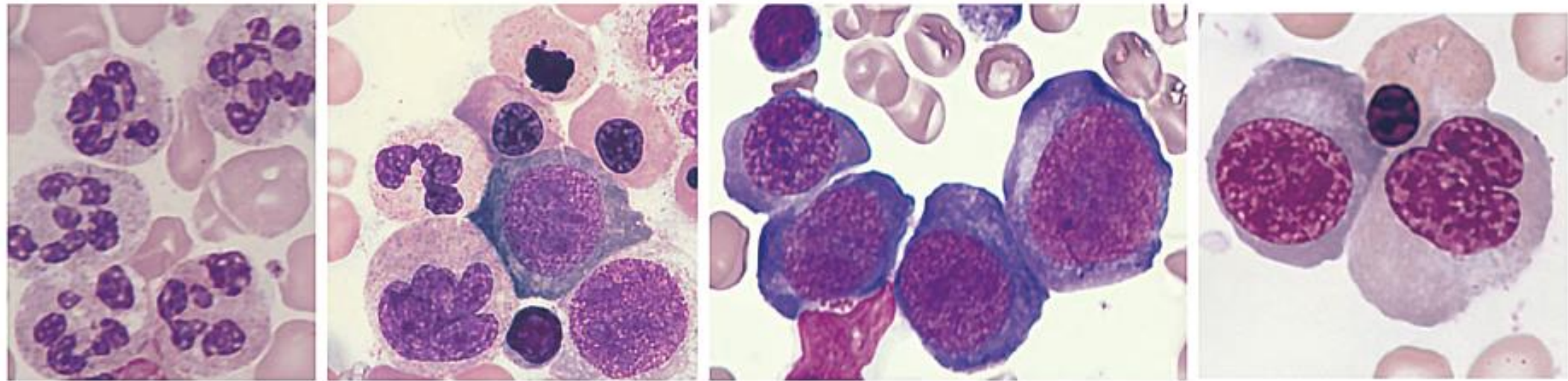
شکل ۱۱-۲۷: از راست به چپ: (۱) سلول‌های پلی کروماتوفیل (معادل رتیک در خون محیطی)، (۲) رسوب داخل سلولی رتیکولوسیت، (۳) هسته در حال خروج از OCN که به شکل گیری پیرنوسیت ختم می‌شود و (۴) یک RBC هسته‌دار یا N-RBC که معادل OCN در خون محیطی محسوب می‌شود.



شکل ۱۷-۲۷: منظره پلی کرومازی در خون محیطی رنگ شده با زنگ آمیزی رایت- گیمسا (شکل سمت چپ) و رنگ آمیزی حیاتی BCB از همان بیمار که رتیکولوسیتوز مشخصی را نشان می‌دهد (شکل سمت راست).

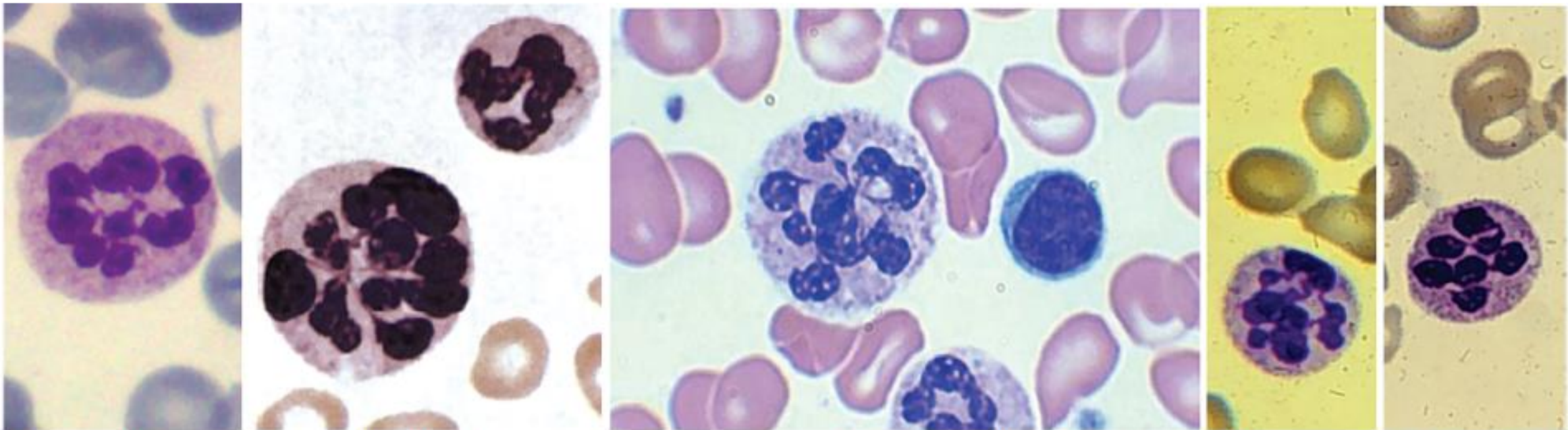


شکل ۱۵-۲۷: از راست به چپ: (۱) پرومگالوبلاست، (۲) بازوفیلیک مگالوبلاست، (۳) پلی کروماتوفیلیک مگالوبلاست و (۴) اورتوکروماتوفیلیک مگالوبلاست [۲۵]

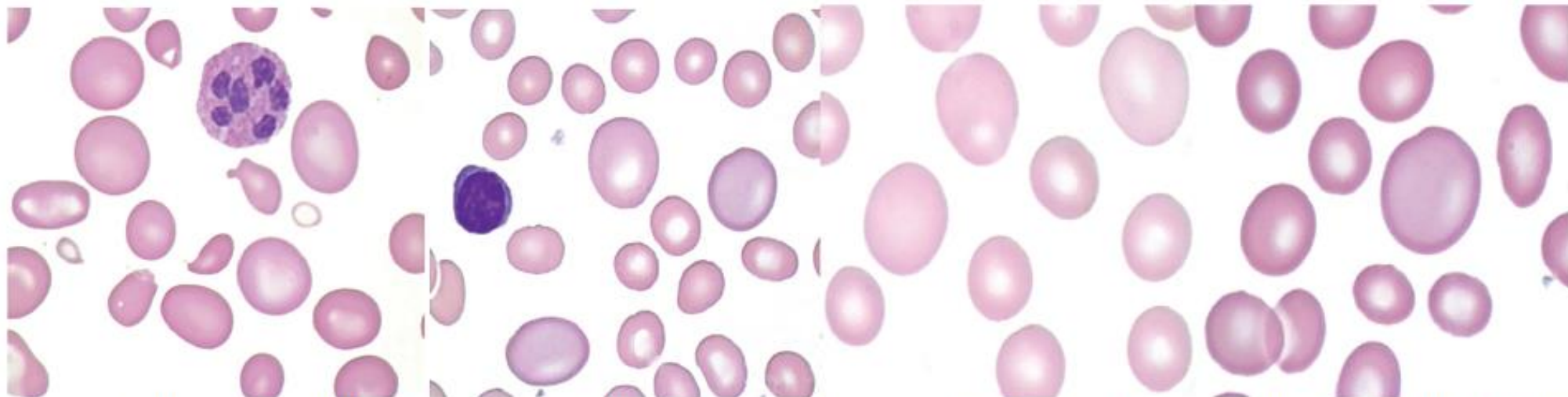


شکل ۱۶-۲۷: از راست به چپ: (۱) بازوفیلیک، پلی کروماتوفیلیک و اورتوکروماتوفیلیک مگالوبلاست در حال خروج هسته، (۲) پرومگالوبلاست، بازوفیلیک مگالوبلاست و پلی کروماتوفیلیک، (۳) جایانت باند، بازوفیلیک و چندین اورتوکروماتوفیلیک مگالوبلاست به همراه یک هسته پیکنوتیک و (۴) نوتروفیل‌های هایپرسمانته و یک انوزینوفیل در آنمی مگالوبلاستیک ناشی از فقر Vit-B12

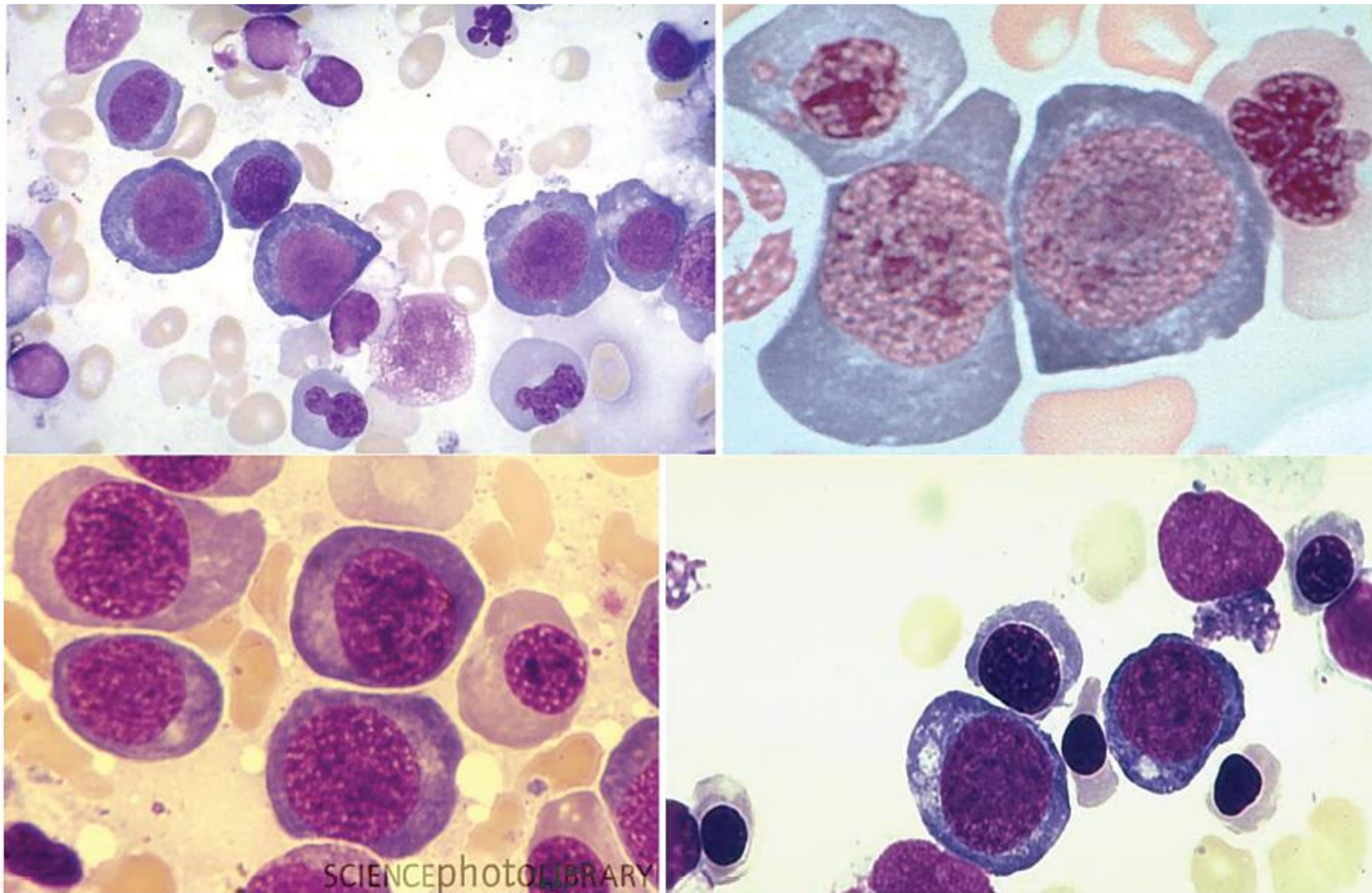
| هفته    | جدول ۴-۴۲: ترتیب ظهور علائم آزمایشگاهی در آنمی مگالوبلاستیک ناشی از فقر فولات [۶] |
|---------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| هفته ۳  | کاهش فولات سرم                                                                    |
| هفته ۵  | افزایش نوتروفیل هیپرسگمانته در BM                                                 |
| هفته ۷  | افزایش نوتروفیل هیپرسگمانته در خون، افزایش سلول‌های میتوتیک، افزایش J-BNB در BM   |
| هفته ۱۰ | افزایش جایانت متامیلوسیت و J-PcNB در BM                                           |
| هفته ۱۳ | افزایش هموسیستئین و FIGLU                                                         |
| هفته ۱۷ | کاهش فولات داخل اریتروسیت                                                         |
| هفته ۱۸ | ظهور ماکروواوالوسیت و افزایش شدید جایانت متامیلوسیت                               |
| هفته ۱۹ | مگالوئید شدن BM در تمامی رده‌های سلولی                                            |
| هفته ۲۰ | آنمی مگالوبلاستیک توأم با پان سیتوپنی و افت هموگلوبین                             |



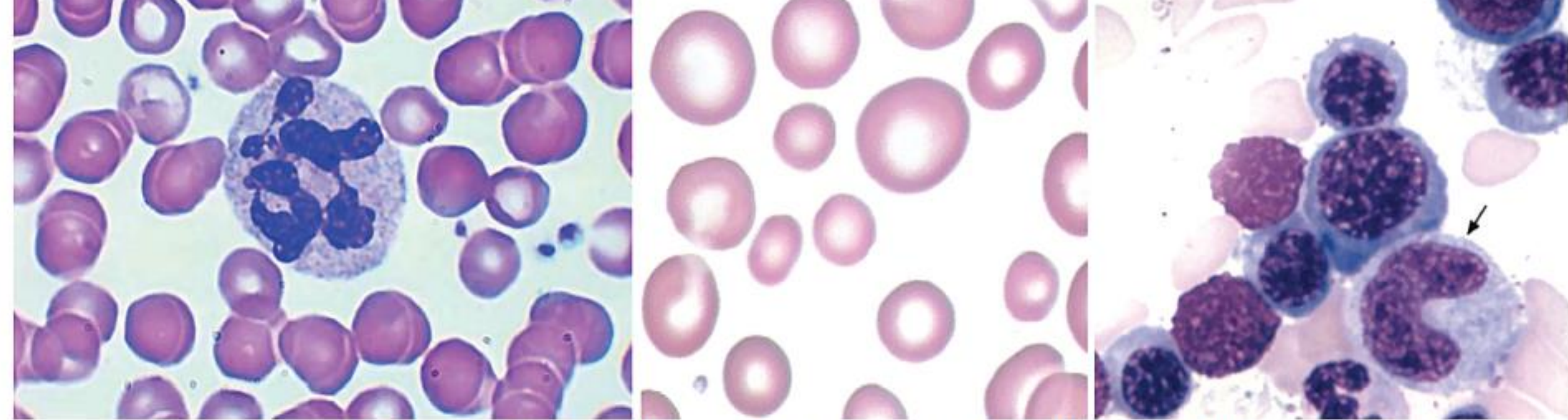
شکل ۴۱-۴۲: نوتروفیل‌های هیپرسگمانته یا ماکروپلیسیت که تعداد بالای ۵٪ نوتروفیل ۵ سگمانته یا حتی یک عدد نوتروفیل ۸-۶ سگمانته دلالت بر نوتروفیل هیپرسگمانته و بروز آنمی مگالوبلاستیک دارد. این منظره در آنمی فقر آهن شدید و چند بیماری دیگر نیز ممکن است مشاهده شود [۲۴].



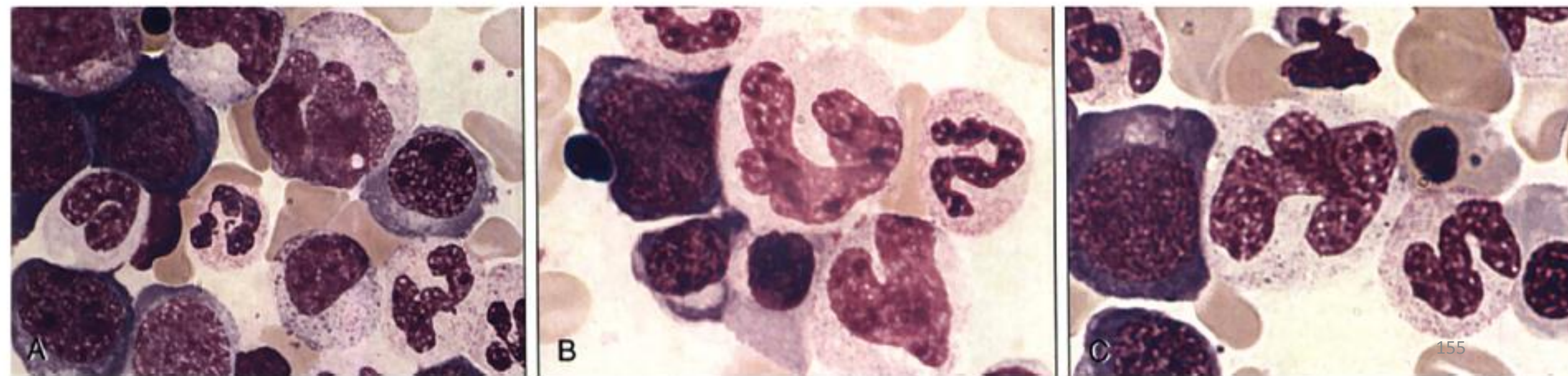
شکل ۴۳-۴۴: ماکروسیتوز محسوس اریتروسیت‌ها که با درجات متوسطی از آنیزوسیتوز، پوئیکیلوسیتوز و حضور ماکروواکوسیت‌ها، میکروسیت‌ها و سلول‌های داکروسیت همراه می‌باشد. برای درک ماکروسیتوز، سلول‌های نرمال را در کنار آنها مقایسه کنید. نکته جالب اینکه علی‌رغم ماکروسیتوز و افزایش MCV، تعداد قابل توجهی میکروسیت نیز رویت می‌شود.

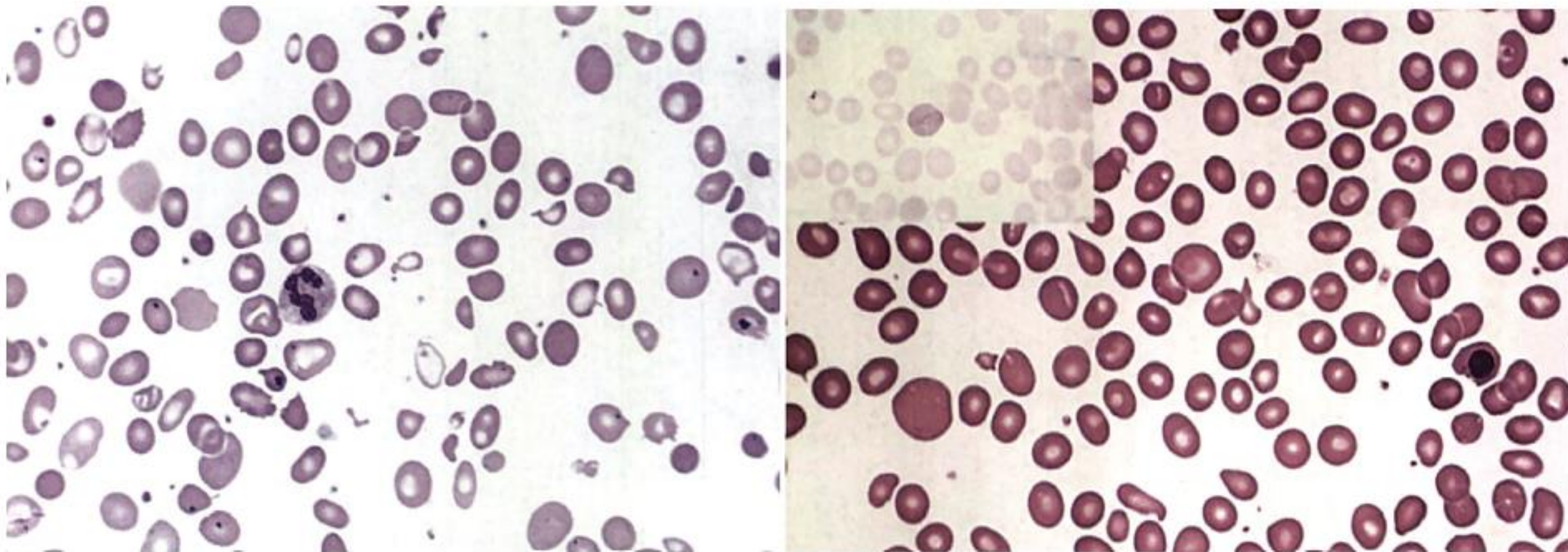


شکل ۴۲-۴۳: نورموبلاست‌های بزرگ و جایانت (به‌ویژه J-BNB و J-PcNB) در آنمی مگالوبلاستیک که با درجات بالایی از دیسپلازی اریتروئیدی و کروماتین لانه زنبوری (حتی در OcNB) همراه می‌باشد.

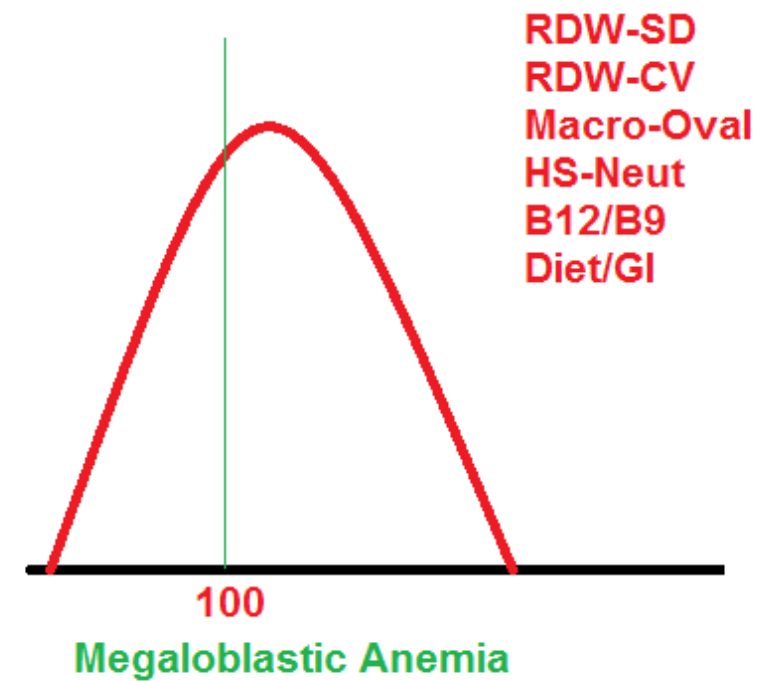
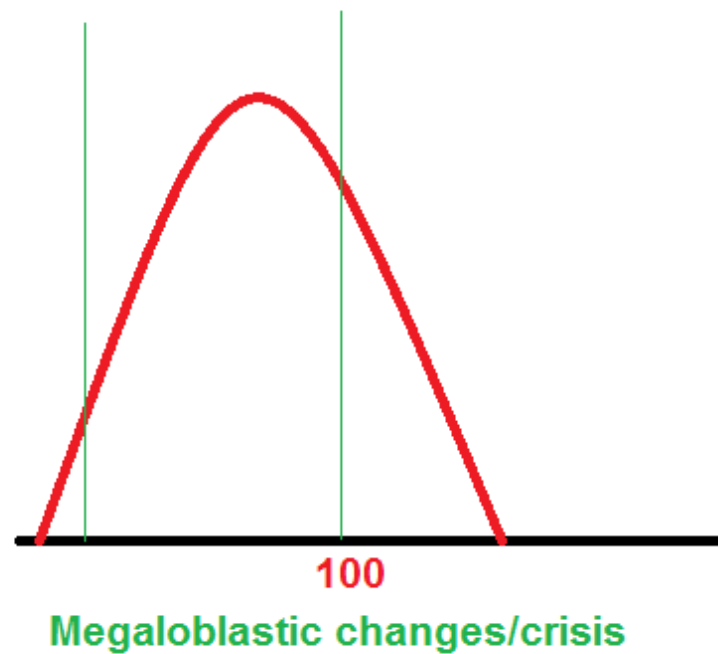
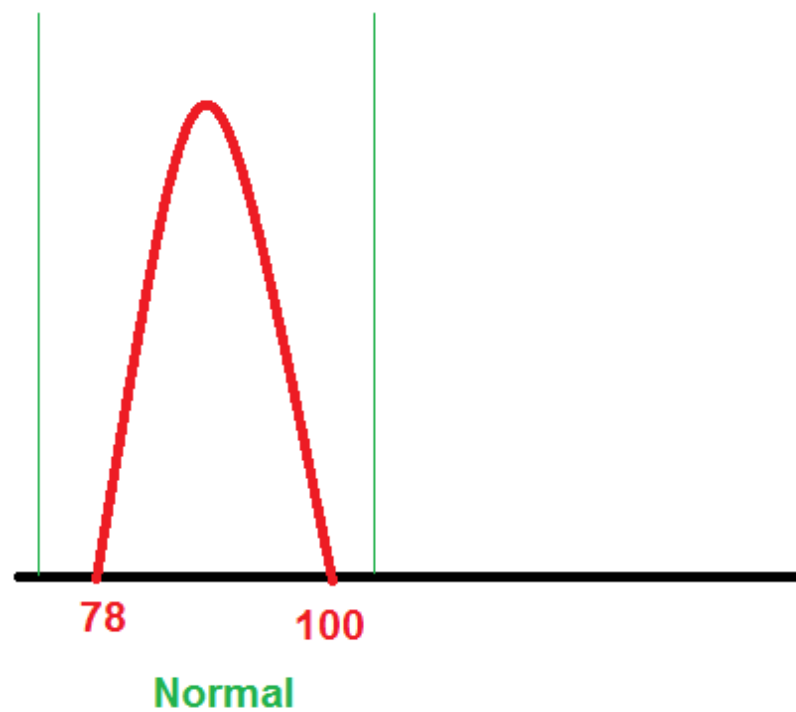


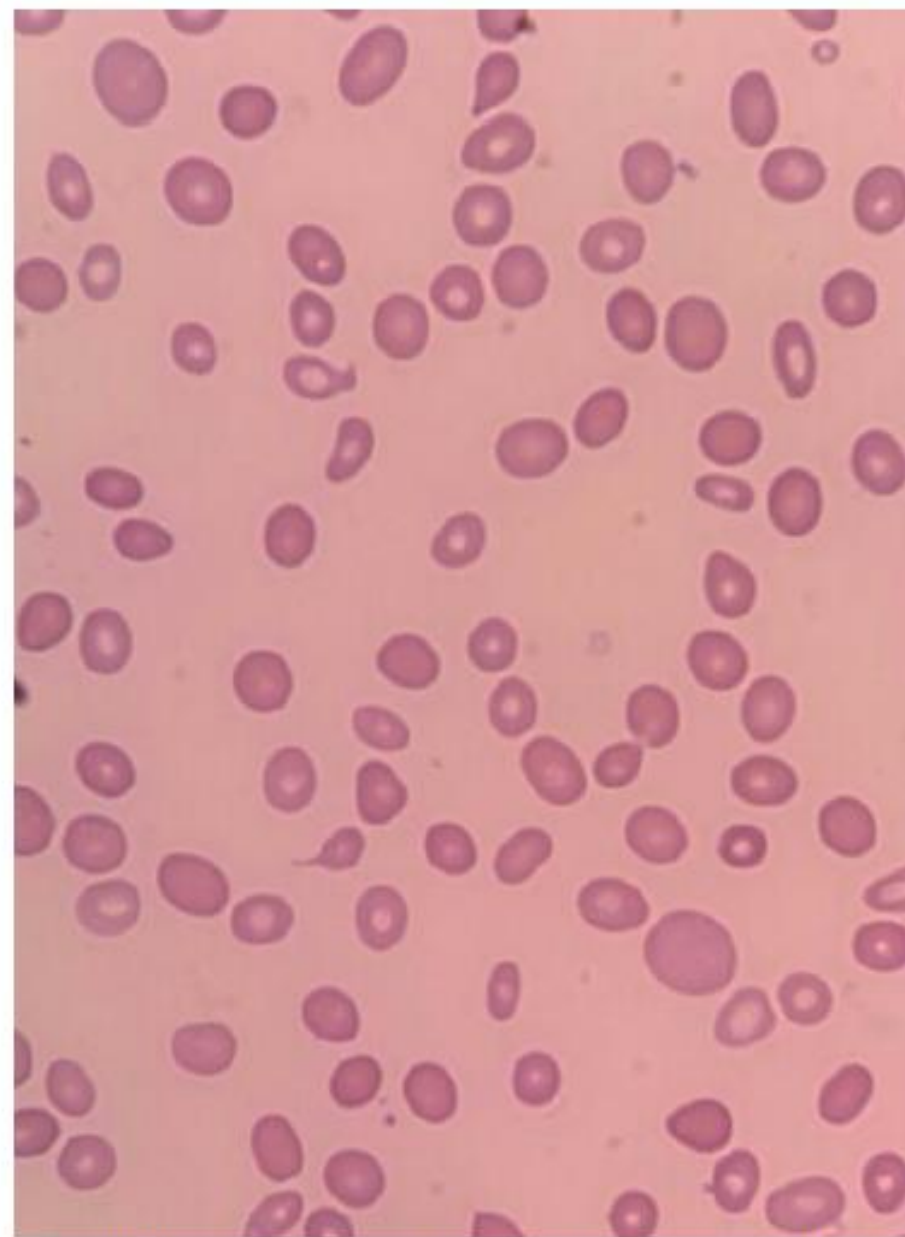
شکل ۴۶-۴۲: راست) جایانت متامیلوسیت، وسط) ماکروسیتوز و چپ) نوتروفیل هیپرسگمانته در آنمی مگالوبلاستیک



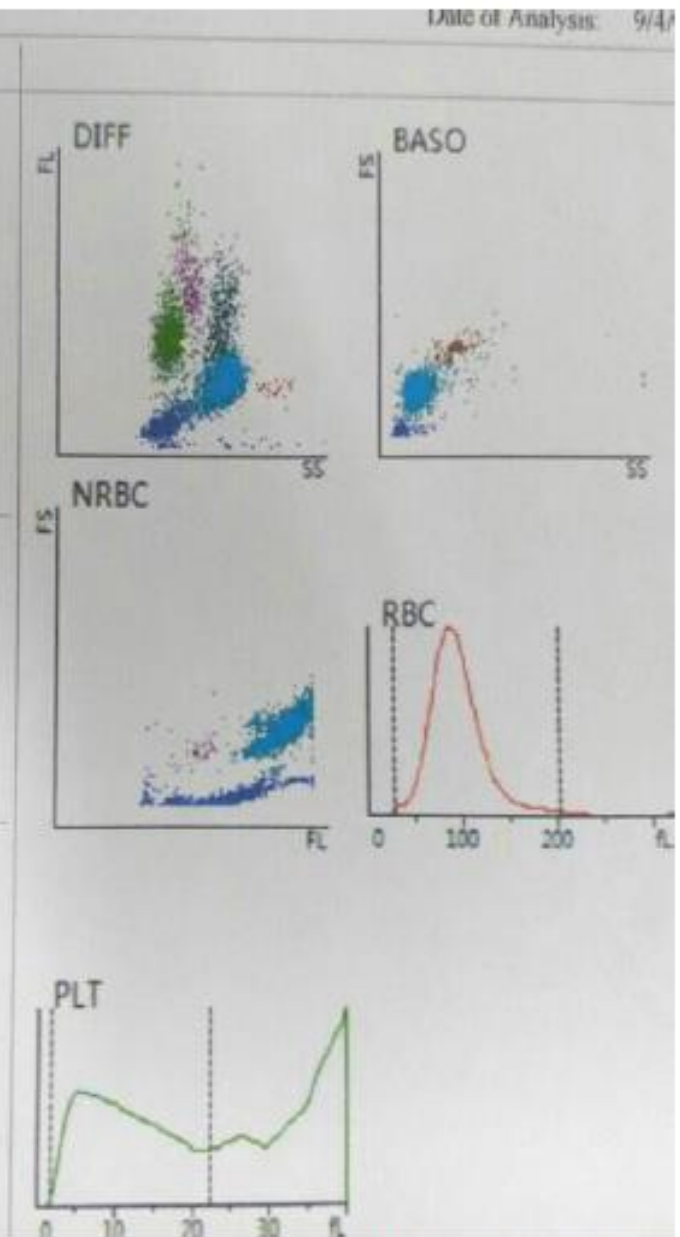


شکل ۴۹-۴۲: راست) آنیزوسیتوز متوسط به همراه کابوت رینگ (تصویر راست-بالا)، داکروسیت، میکروسیت و N-RBC، تصویر چپ) آنیزوسیتوز شدید به همراه اجسام هاول جولی در بیمار مبتلا به آنمی پرئیشیوز و آتروفی طحالی

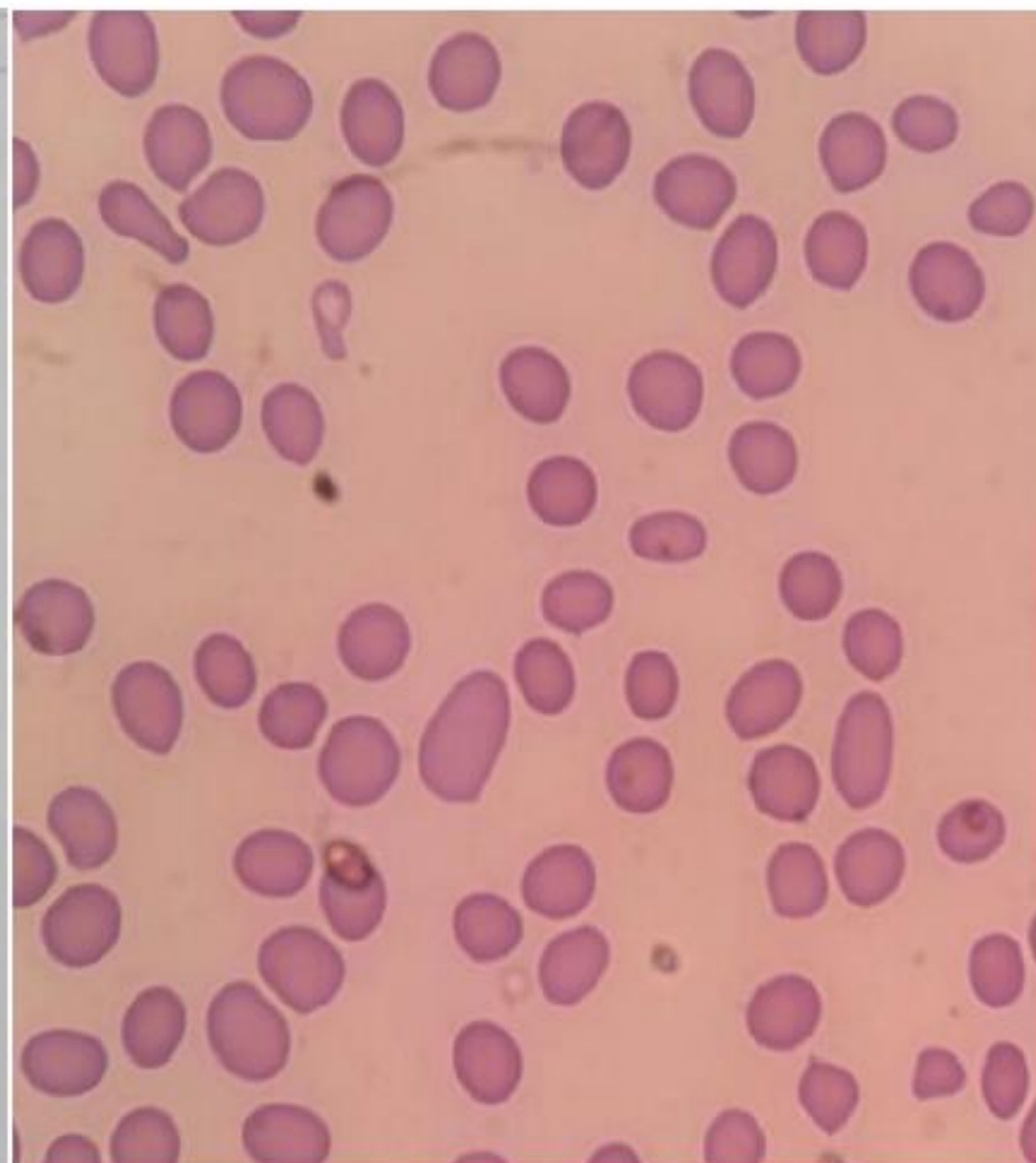
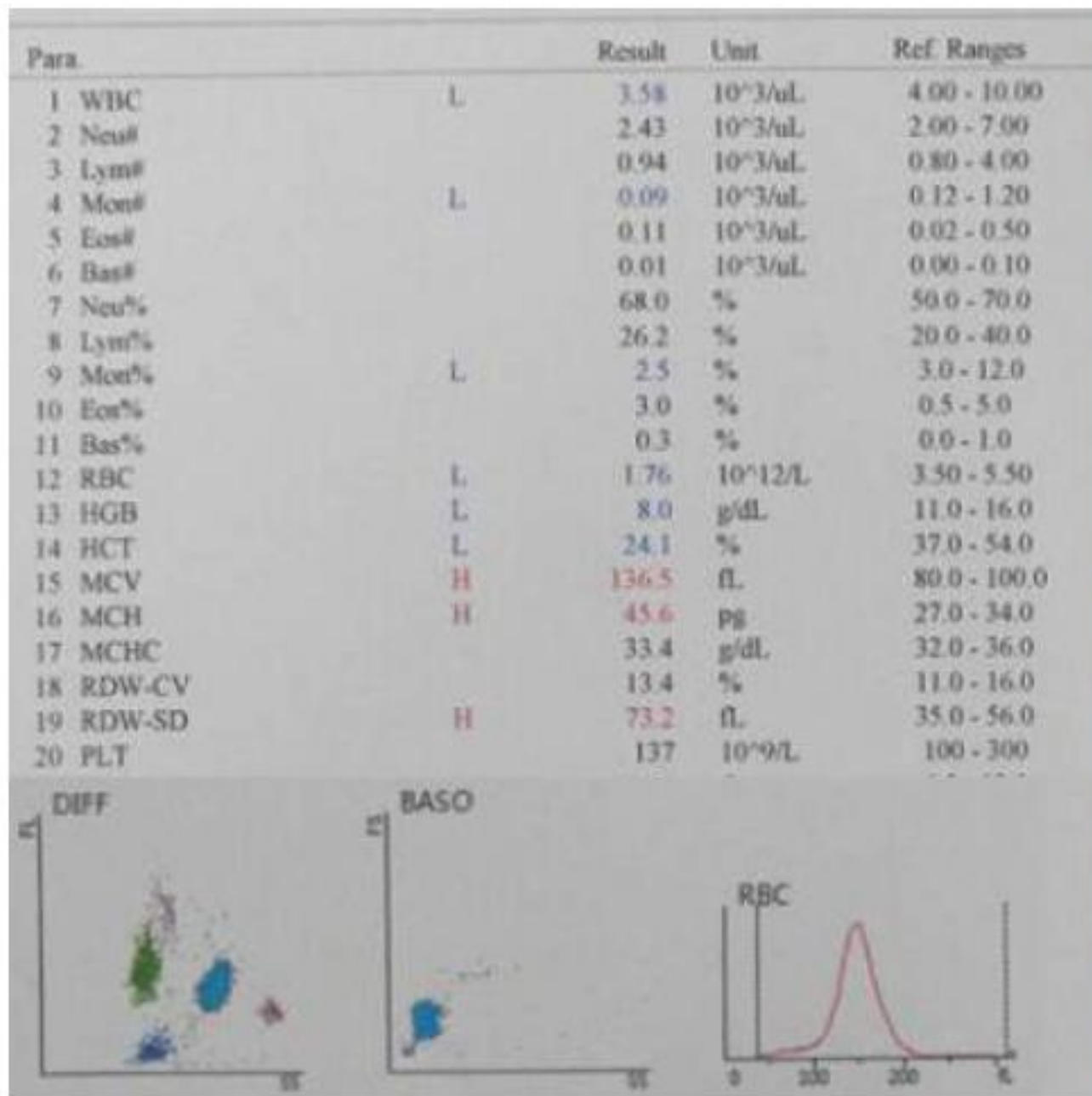




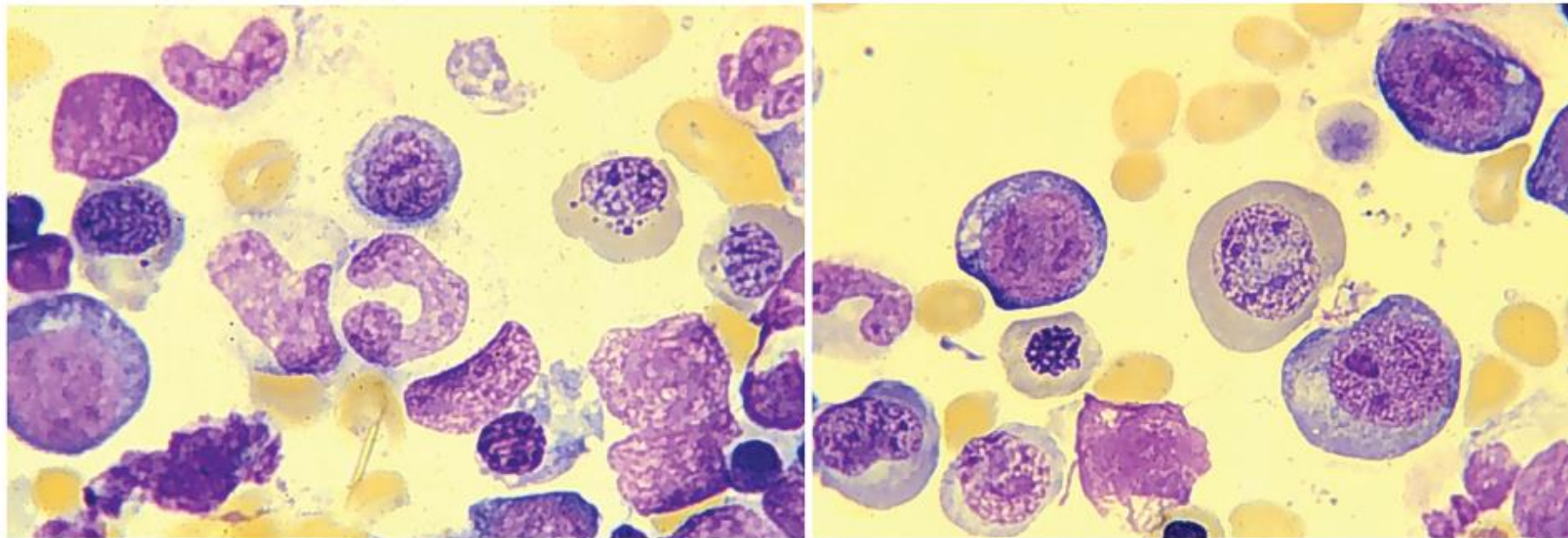
| Para.     | Result | Unit                    | Ref. Ranges      |
|-----------|--------|-------------------------|------------------|
| 1 WBC     | 5.95   | & 10 <sup>3</sup> /uL   | 5.10 - 21.90     |
| 2 Neu#    | 4.35   | &R 10 <sup>3</sup> /uL  | 1.00 - 8.90      |
| 3 Lym#    | 1.19   | & L 10 <sup>3</sup> /uL | 2.50 - 16.50     |
| 4 Mon#    | 0.24   | 10 <sup>3</sup> /uL     | 0.20 - 1.10      |
| 5 Eos#    | 0.03   | RL 10 <sup>3</sup> /uL  | 0.10 - 0.99      |
| 6 Bas#    | 0.14   | R 10 <sup>3</sup> /uL   | 0.01 - 0.65      |
| 7 Neu%    | 73.2   | &RH%                    | 18.0 - 50.0      |
| 8 Lym%    | 19.9   | & L %                   | 31.0 - 56.0      |
| 9 Mon%    | 4.0    | L %                     | 6.0 - 18.0       |
| 10 Eos%   | 0.5    | RL %                    | 2.0 - 7.0        |
| 11 Bas%   | 2.4    | RH %                    | 0.0 - 1.0        |
| 12 RBC    | 2.64   | L 10 <sup>12</sup> /L   | 3.30 - 5.50      |
| 13 HGB    | 7.1    | L g/dL                  | 10.5 - 20.2      |
| 14 HCT    | 22.7   | L %                     | 31.0 - 55.0      |
| 15 MCV    | 86.1   | fL                      | 85.0 - 112.0     |
| 16 MCH    | 26.9   | pg                      | 25.0 - 34.0      |
| 17 MCHC   | 31.2   | L g/dL                  | 33.9 - 35.3      |
| 18 RDW-CV | 24.6   | H %                     | 15.0 - 17.5      |
| 19 RDW-SD | 81.3   | H fL                    | 35.0 - 56.0      |
| 20 PLT    | 92     | RL 10 <sup>9</sup> /L   | 210 - 640        |
| 21 MPV    | 11.4   | R fL                    | 6.5 - 12.0       |
| 22 PDW    | 16.6   | R                       | 15.0 - 17.0      |
| 23 PCT    | 0.105  | RL %                    | 0.108 - 0.282    |
| 24 P-LCC  | 41     | R 10 <sup>9</sup> /L    | 30 - 90          |
| 25 P-LCR  | 44.5   | R %                     | 11.0 - 45.0      |
| 26 NRBC#  | 0.076  | 10 <sup>3</sup> /uL     | 0.000 - 9999.999 |
| 27 NRBC%  | 1.28   | /100WBC                 | 0.00 - 9999.99   |
| 28 IMG#   | 0.55   | 10 <sup>9</sup> /L      | 0.00 - 999.99    |
| 29 IMG%   | 0.092  |                         | 0.000 - ...      |



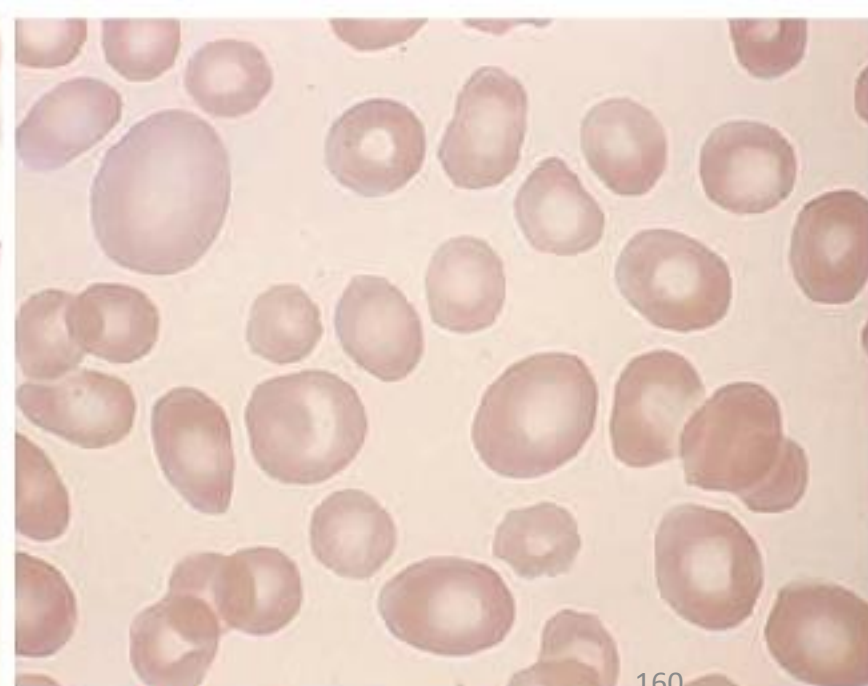
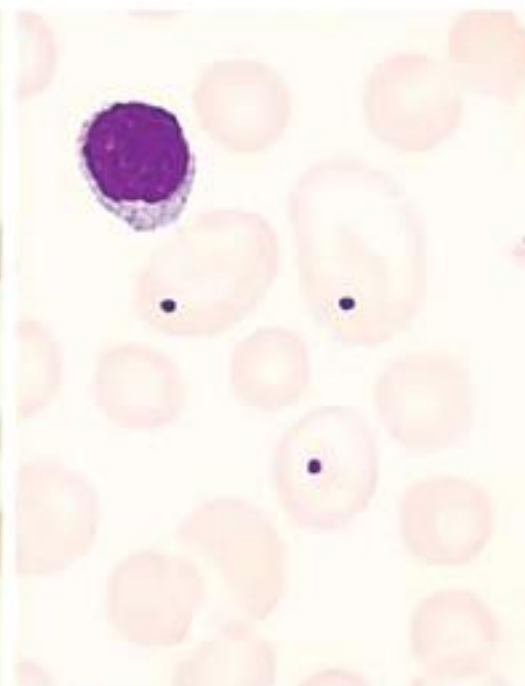
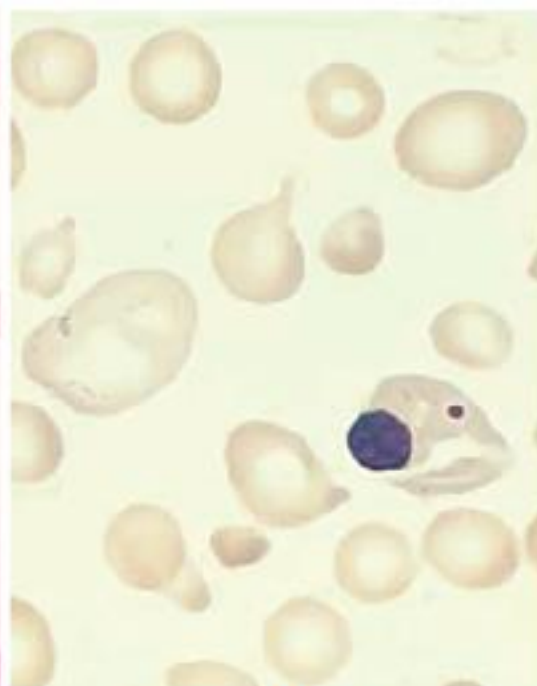
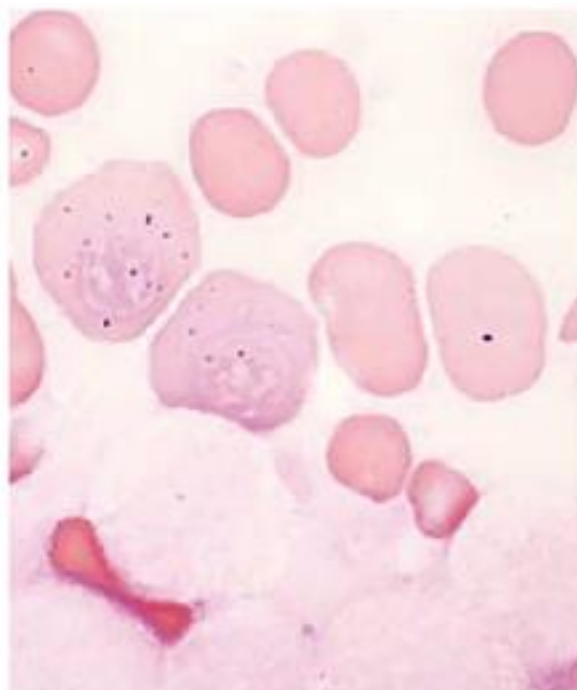
شکل ۶۴-۱۰: کریز مگالوبلاستیک در بیمار مبتلا به آنمی میکروسیتیک-هیوکروم که از یک طرف باعث مخفی شدن MCV پایین شده و از طرفی دیگر باعث افزایش محسوس RDW شده است که وجود مقادیر بالای RDW در چنین مواردی حضور نوعی دی مورفیسم پنهان را آشکار می‌کند. در این بیمار هیستوگرام RBC دو قله‌ای یا Bimodal نبوده ولی PBS حاکی از دو جمعیتی بودن بارز دارد. در آنمی آپلاستیک شدید درجانی از پانسیتوپنی دیده می‌شود که این بیمار آنمی و ترومبوسیتوپنی واضحی را نشان می‌دهد.



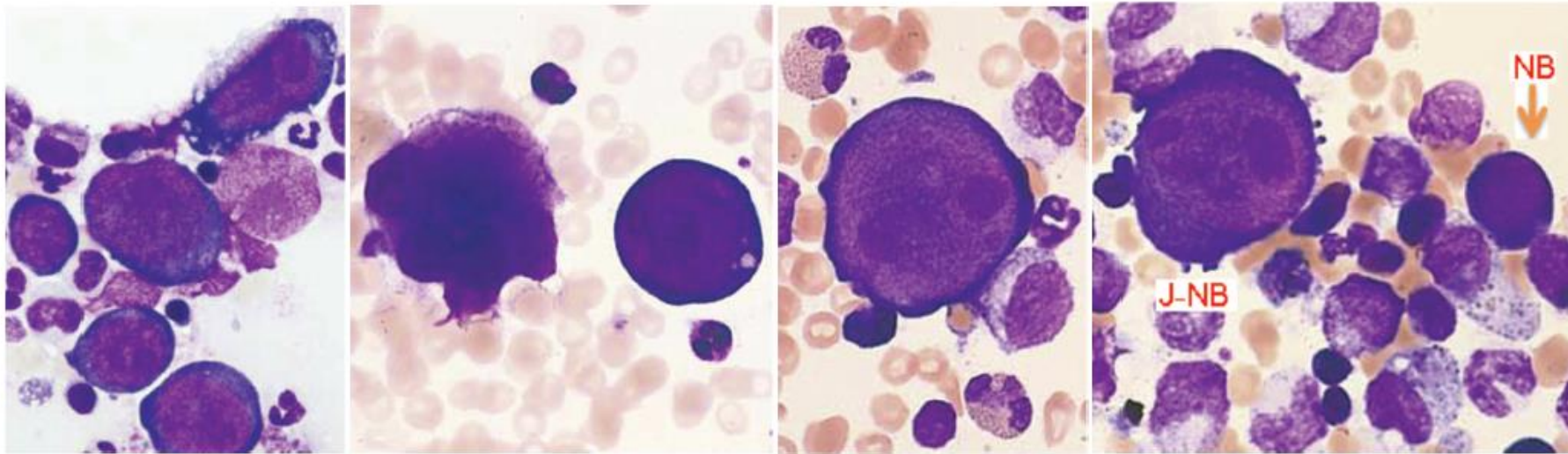
شکل ۱۳۶-۱۰: اثر ماکروسیتوز شدید در کاهش شدید و کاذب RDW-CV علی‌رغم افزایش محسوس و واقعی RDW-SD



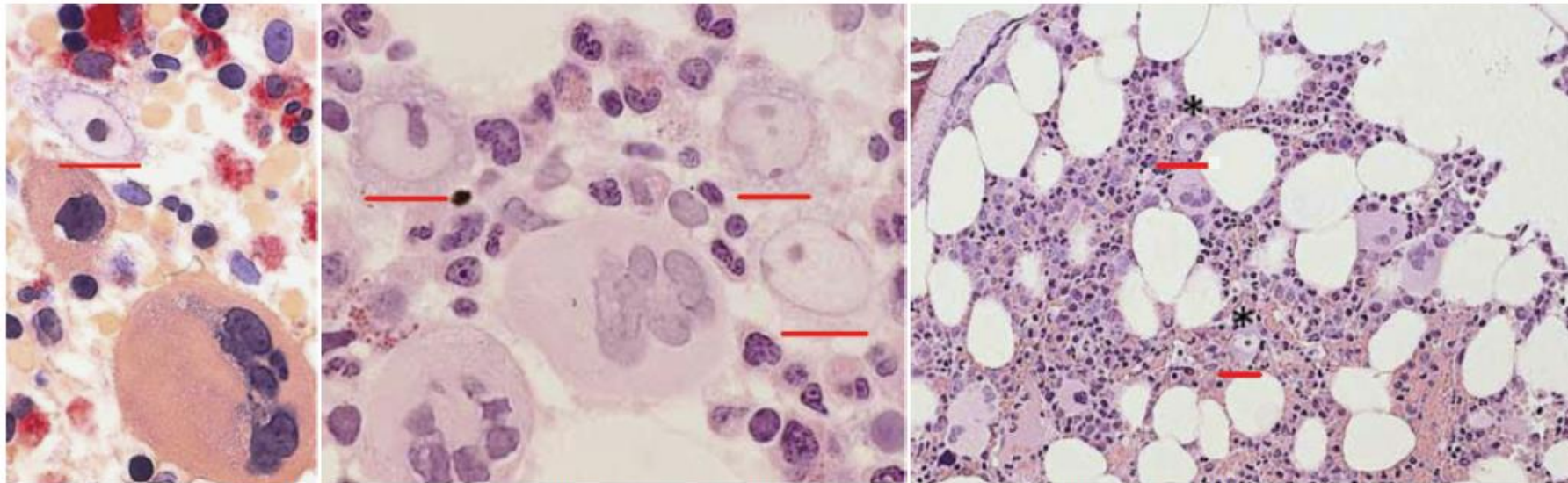
شکل ۵۱-۴۲: انواع مختلف جایانت نورموبلاست و جایانت متامیلوسیت در آنمی مگالوبلاستیک که از هسته نارس و کروماتین لانه زنبوری نیز برخوردار هستند.



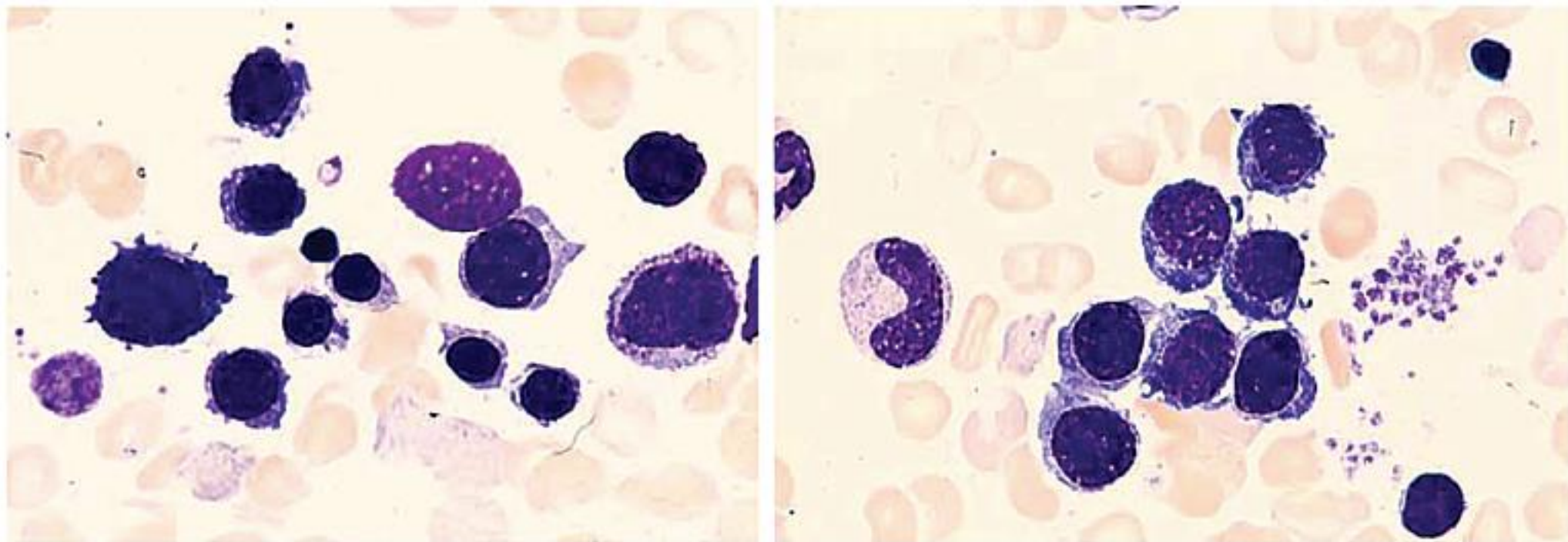
شکل ۵۲-۴۲: (۱) ماکروسیتوز، (۲) هاول جولی، (۳) ماکروسیتوز، هاول جولی و N-RBC (۴) افزایش سیدروزومها در نورموبلاستهای جایانت (رنگ آمیزی پرل)



شکل ۳۹-۲۰: حضور جایانت نورموبلاست (J-NB) در آسپیراسیون BM بیمار مبتلا به اریتروبلاستوپنی ناشی از عفونت با PV-B19: به اندازه J-NB در مقایسه با NB نرمال (شکل ۱)، اتوزینوفیل (شکل ۲)، مگاکاریوسیت (شکل ۳) و یک پرومیلوسیت (شکل ۴) دقت کنید [۲۹].



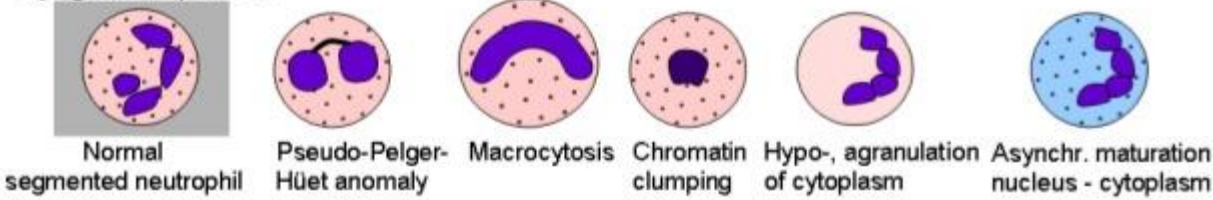
شکل ۴۰-۲۰: حضور جایانت نورموبلاست (J-NB) در بیوپسی از BM بیمار مبتلا به اریتروبلاستوپنی ناشی از عفونت با PV-B19: در برش‌های پاتولوژیکی از BM که با رنگ H&E رنگ آمیزی می‌شوند، هسته سلول‌های J-NB بسیار کم‌رنگ، هسته آنها بسیار مشخص و سیتوپلاسم آنها نیز کم‌رنگ دیده می‌شود. خطوط قرمز در زیر J-NB‌ها جایگاه آنها را در بیوپسی مشخص نموده است. تصویر سوم با رنگ CAE رنگ آمیزی شده است. در هر سه تصویر مگاکاریوسیت‌های بزرگی نیز دیده می‌شوند.



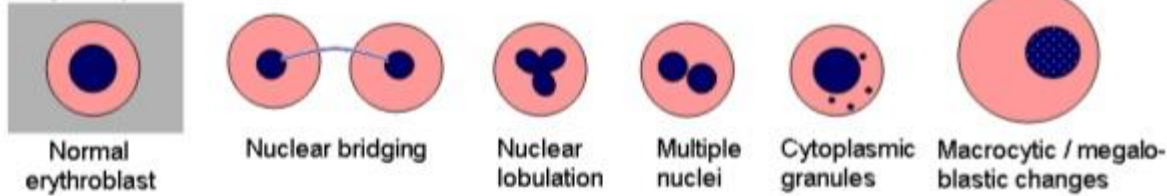
شکل ۳۷-۳۸: بازوفیلیک نورموبلاست‌های پرتعداد، کوچک، نارس با دیواره نامنظم و ریش‌ریش و اورتوکروماتوفیلیک نورموبلاست‌های غیرهموگلوبینه با سیتوپلاسم کوچک و هتروژن. در این نورموبلاست‌ها یک عدم هماهنگی مابین بلوغ هسته با سیتوپلاسم دیده می‌شود، به‌طوری‌که هسته فرمی بالغ داشته ولی سیتوپلاسم نارس، کوچک و بازوفیلیک باقی می‌ماند (اریتروپوئز میکرونورموبلاستیک). همان‌طوری‌که مشهود است هیچ سیدروبلاست یا سیدروسیتی در BM بیماران مشاهده نمی‌شود.

## Dysplasia in Myelodysplastic Syndrome

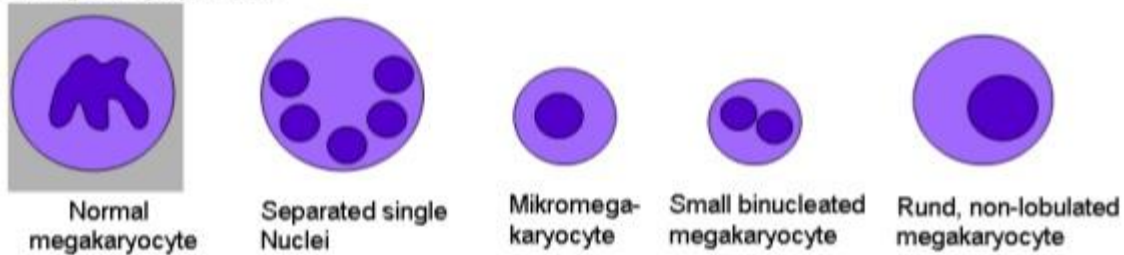
### Dysgranulopoiesis



### Dyserythropoiesis

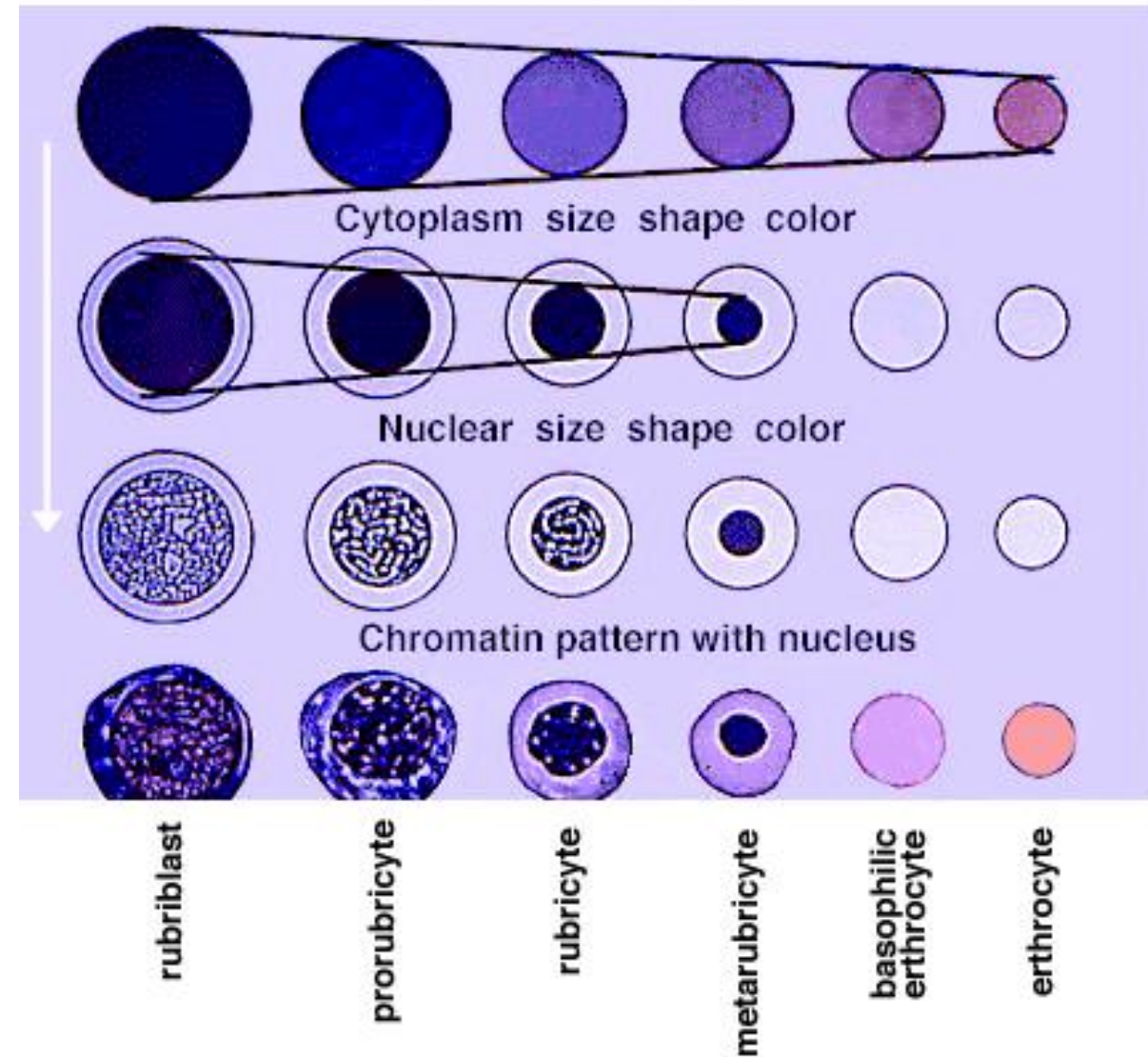


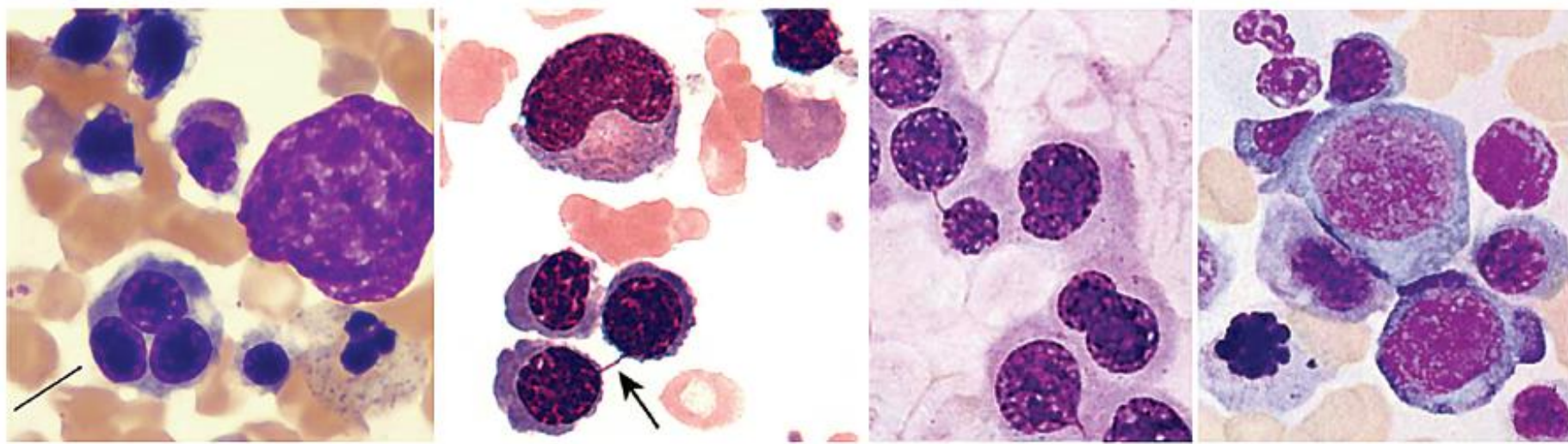
### Dysmegakaryopoiesis



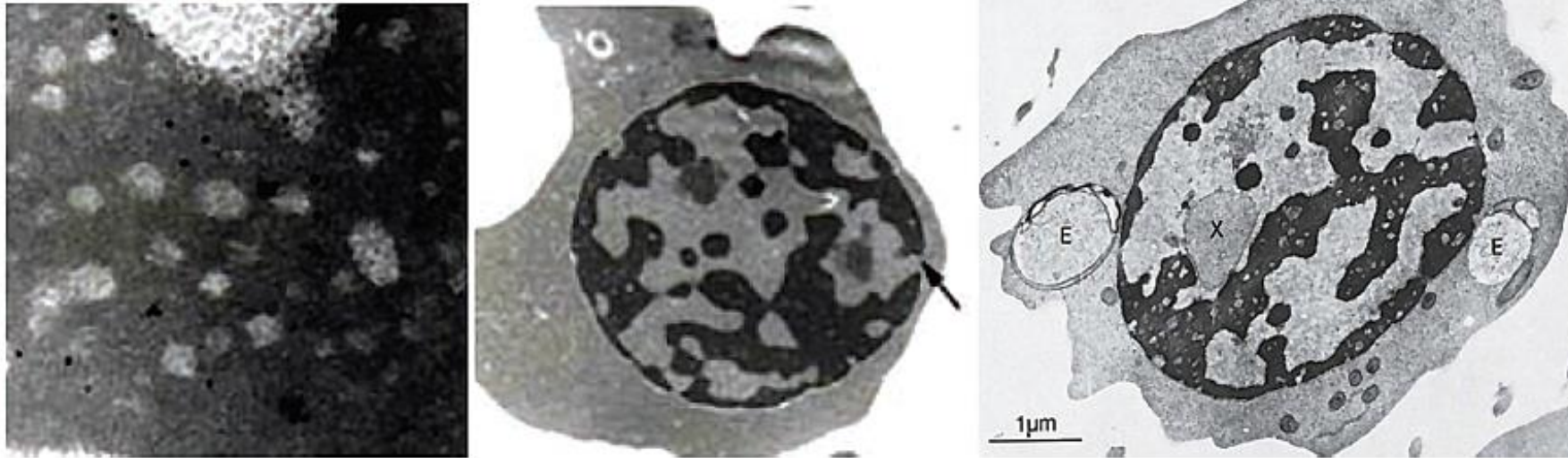
Cantú Rajnoldi et al. Ann Hematol 2005;84:429-33

## RBC Maturation Series

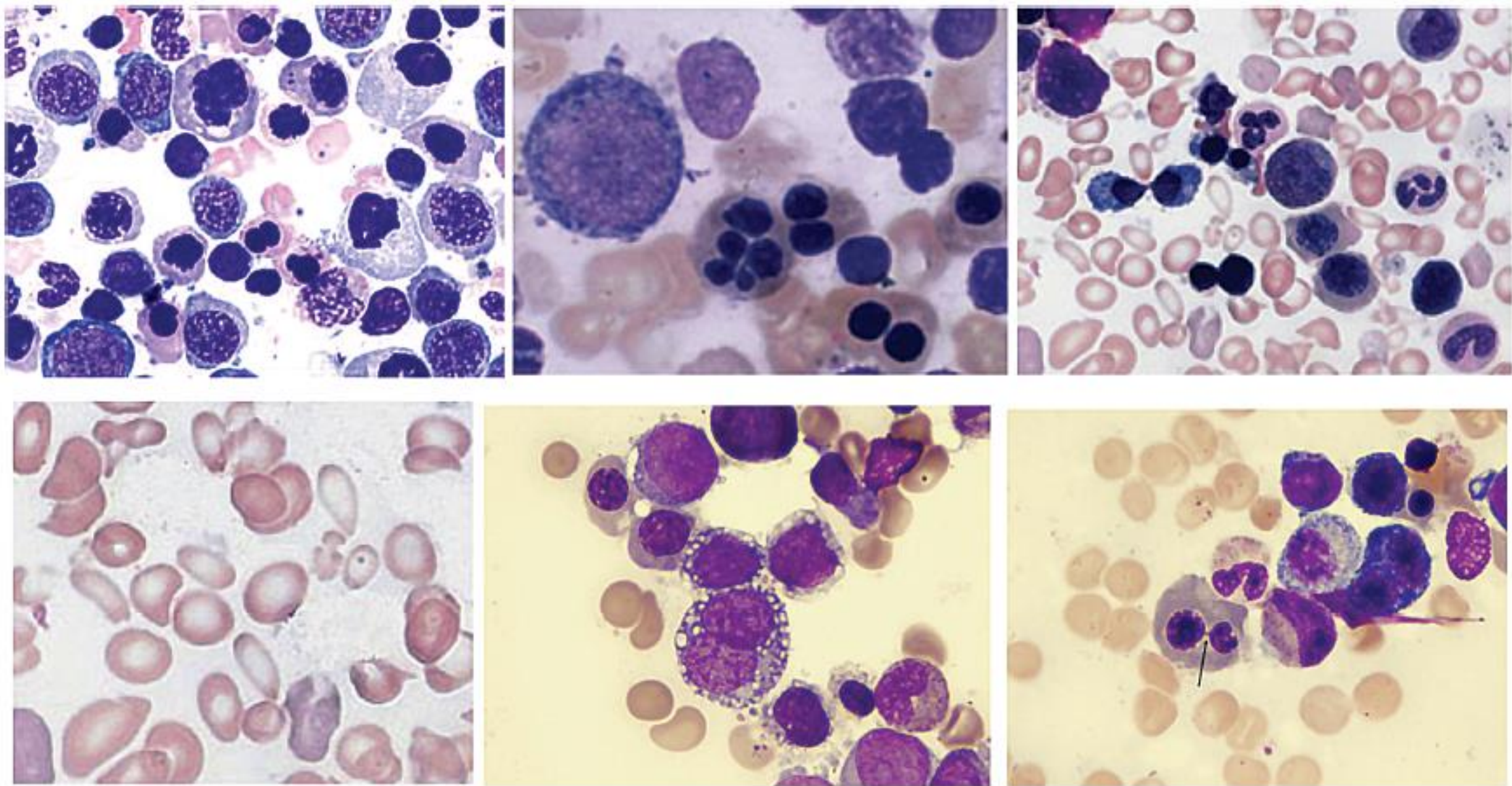




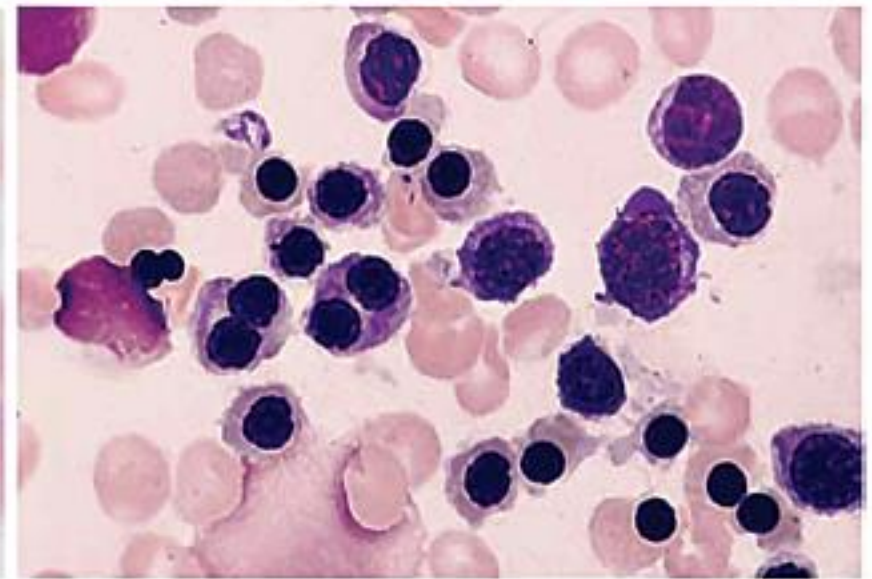
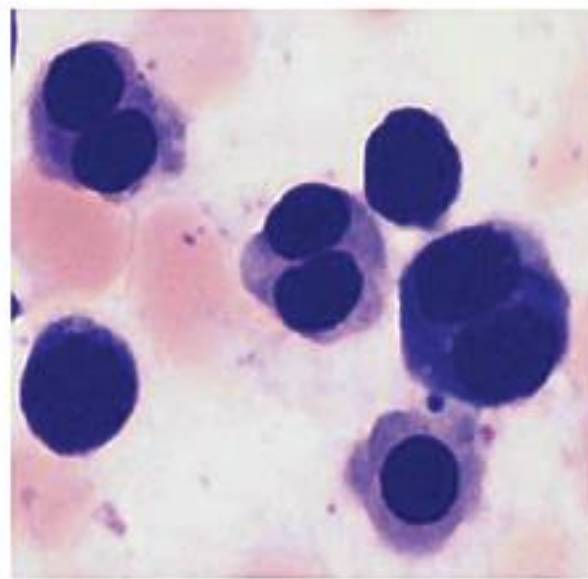
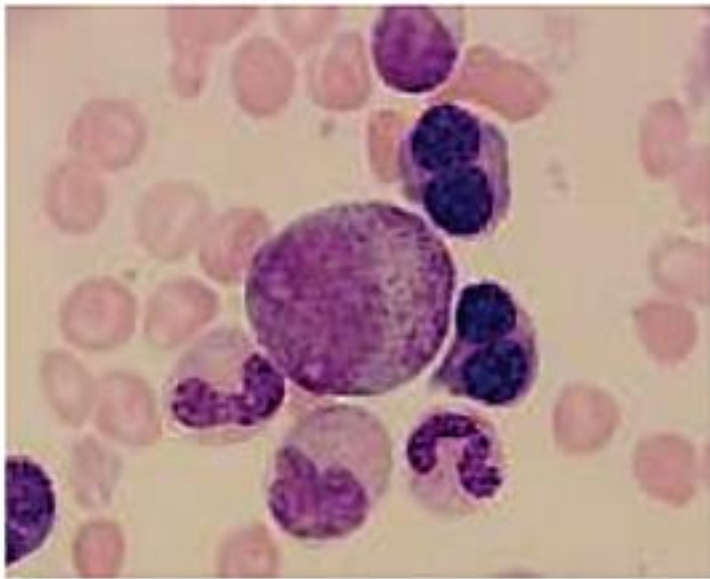
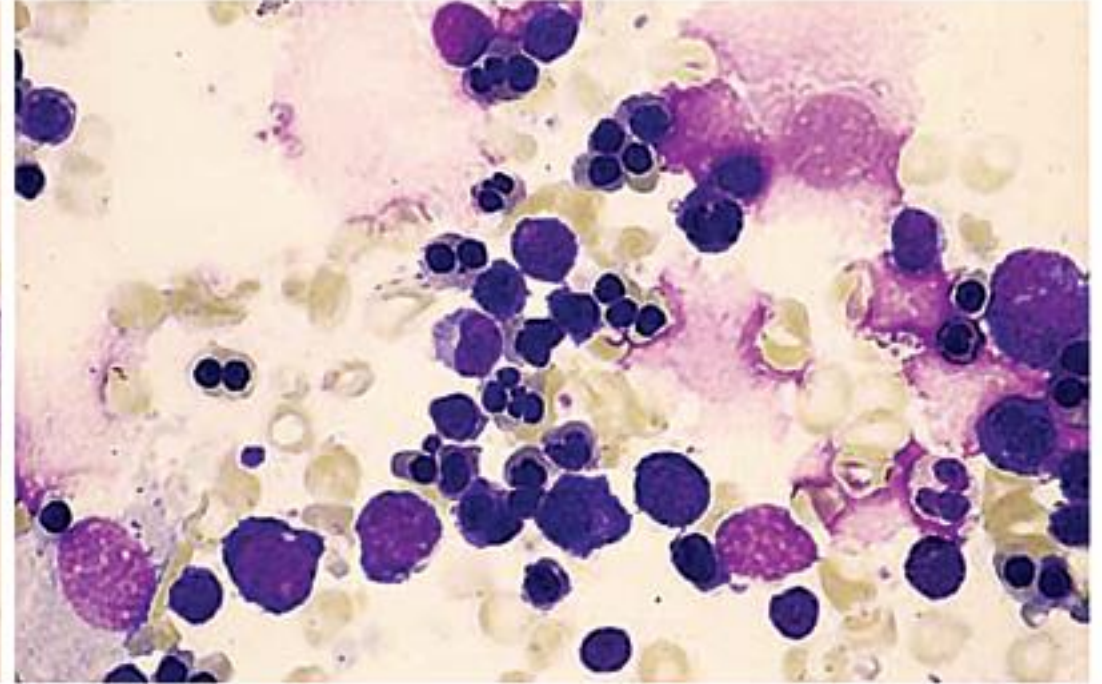
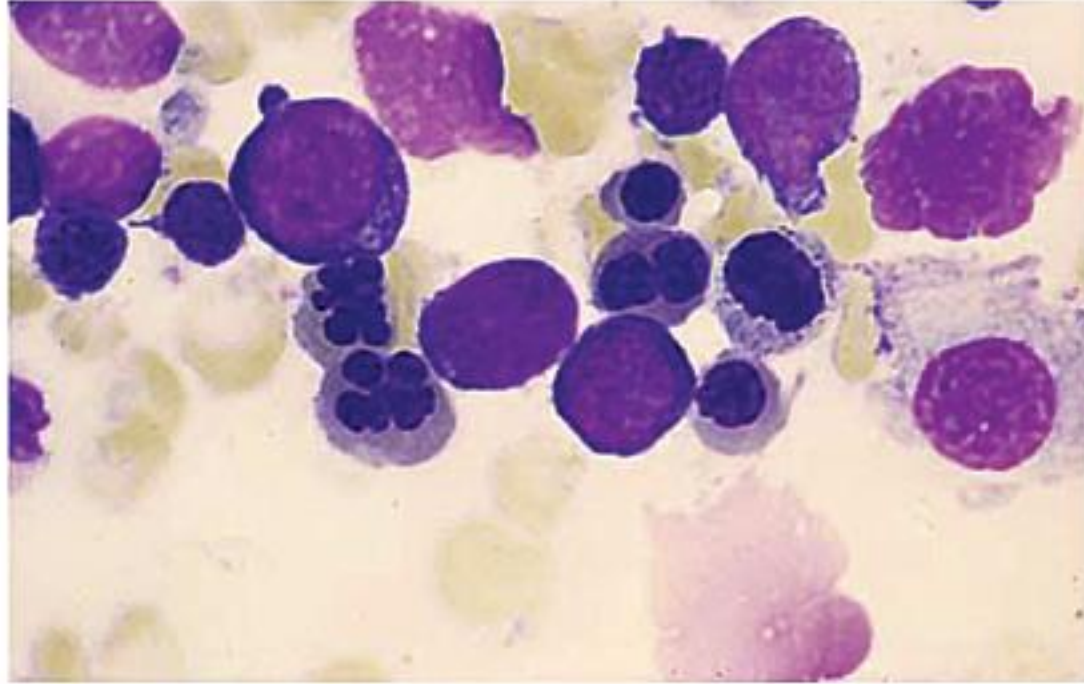
شکل ۳-۳۹: از راست به چپ: (۱) نورموبلاست مگالوبلاست با کروماتین اسفنجی و لانه زنبوری و میتوزهای غیرطبیعی در نورموبلاست‌ها، (۲) پل‌های کروماتینی بین دو هسته نورموبلاست‌ها، توی هم رفتگی و فرو رفتگی غشای هسته و نورموبلاست‌های دو هسته‌ای، (۳) پل کروماتینی بین دو پلی کروماتوفیلیک نورموبلاست (۴) پلی کروماتوفیلیک نورموبلاست سه هسته‌ای [۲۵]



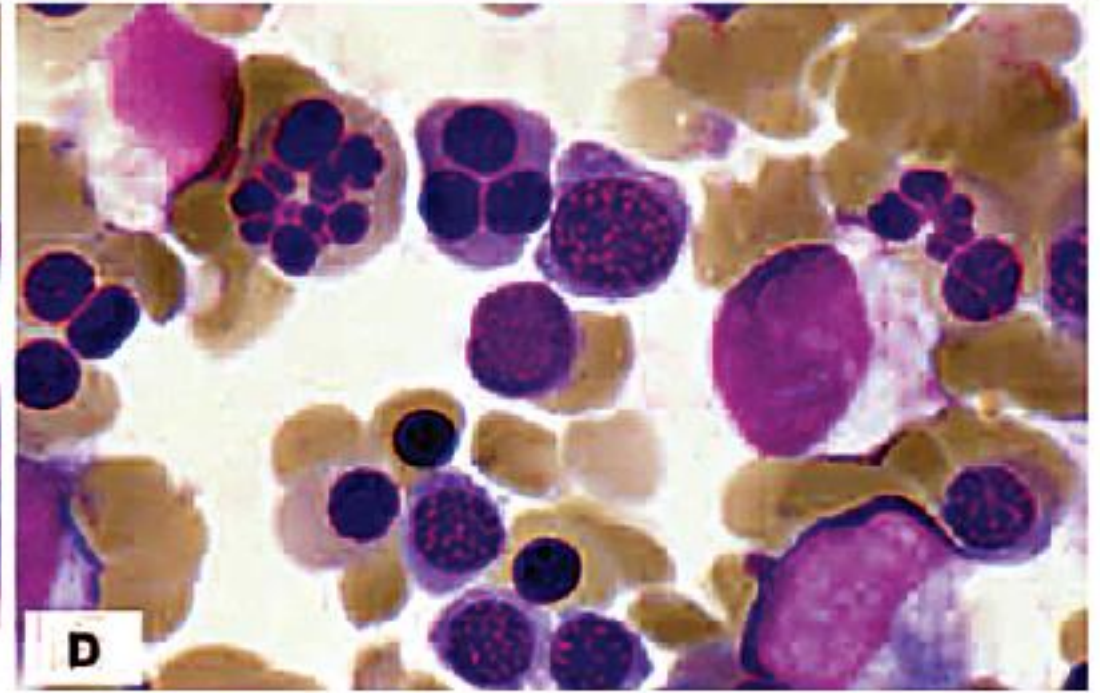
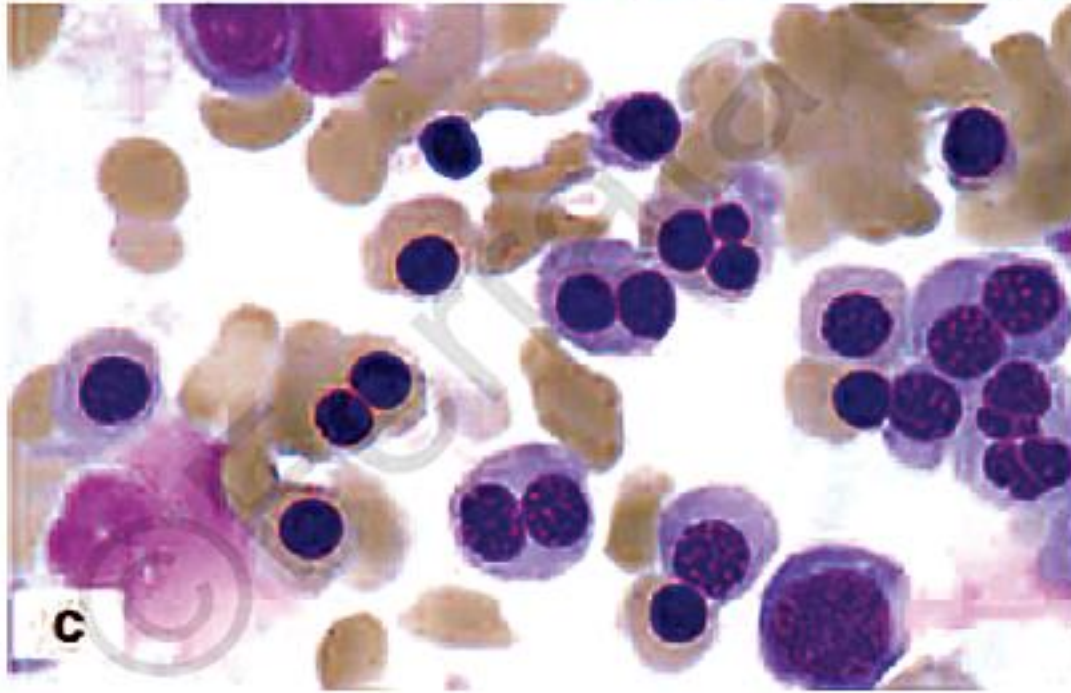
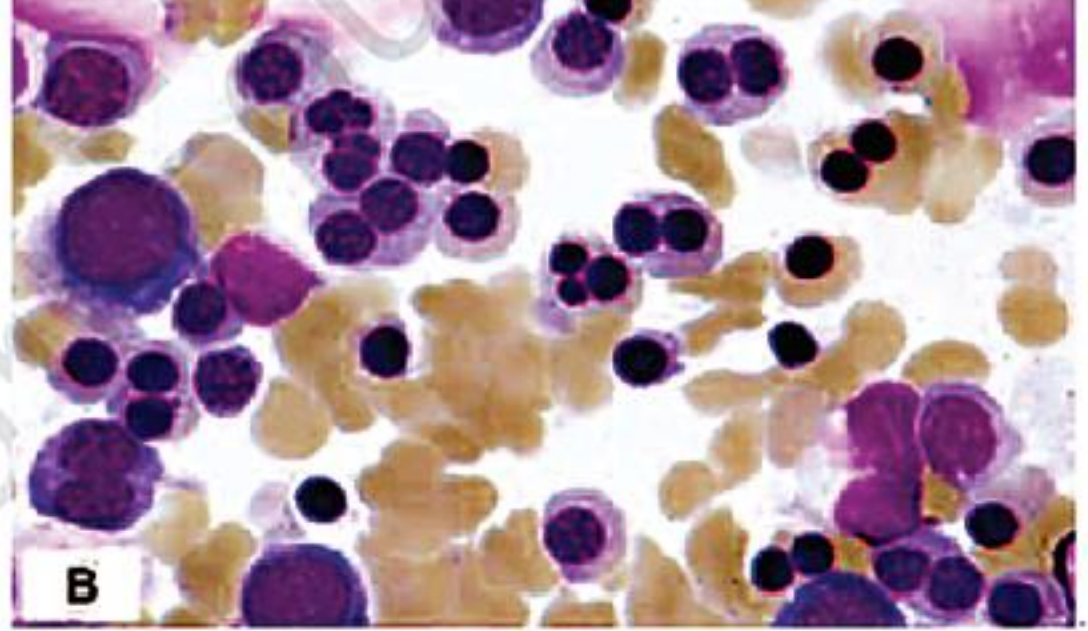
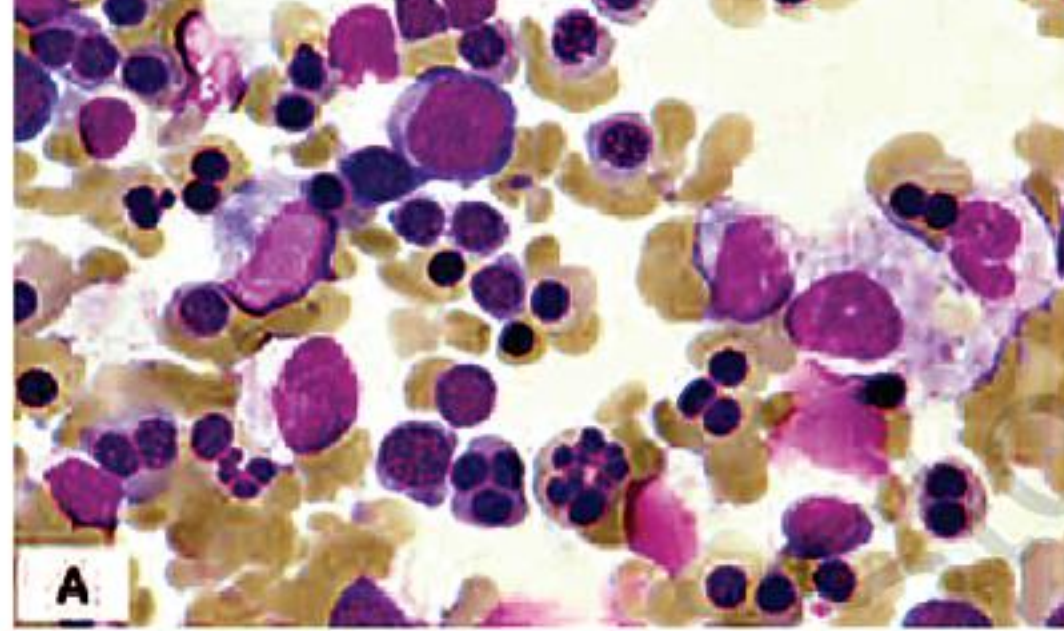
شکل ۴-۳۹: تصویر TEM از نورموبلاست‌های CDA-I که هتروکروماتین غیرطبیعی و اسفنجی شدن هسته (منظره پنیر سوئیسی)، بزرگی و گشاد شدگی شدید سوراخ‌های دیواره هسته (فلش)، اینواژینه شدن سیتوپلاسم در هسته، انتقال اندامک‌های ستوپلاسمیک به داخل هسته (X) و وجود انکلوژیون‌های سیتوپلاسمی (E) در داخل هسته نورموبلاست‌ها را نشان می‌دهد. در هسته‌های اسفنجی، لکه‌های سفیدی به صورت Punched Out نیز مشاهده می‌شود (تصویر سمت چپ) که در نورموبلاست‌های طبیعی دیده نمی‌شود.



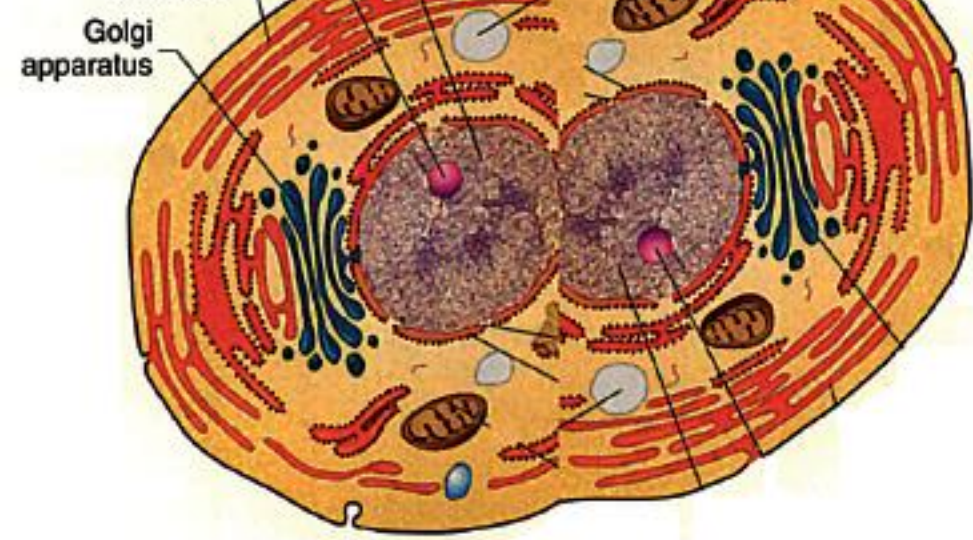
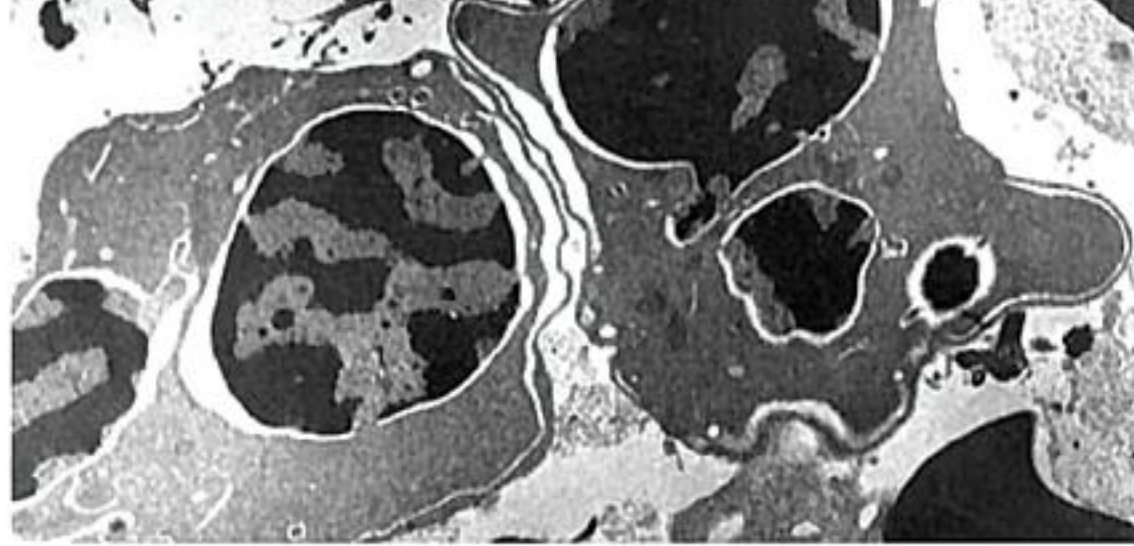
شکل ۷-۳۹: نورموبلاست‌های دو یا چند هسته‌ای، هسته‌های مگالوبلاست و اسفنجی شکل نورموبلاستی و رشته‌های کروماتین بین هسته‌ای در نورموبلاست‌های BM و همچنین، پوئیکیلوسیتوزیس، آنیزوسیتوزیس و ماکروسیتوزیس خفیف در خون محیطی بیمار مبتلا به CDA-I [۲۵].



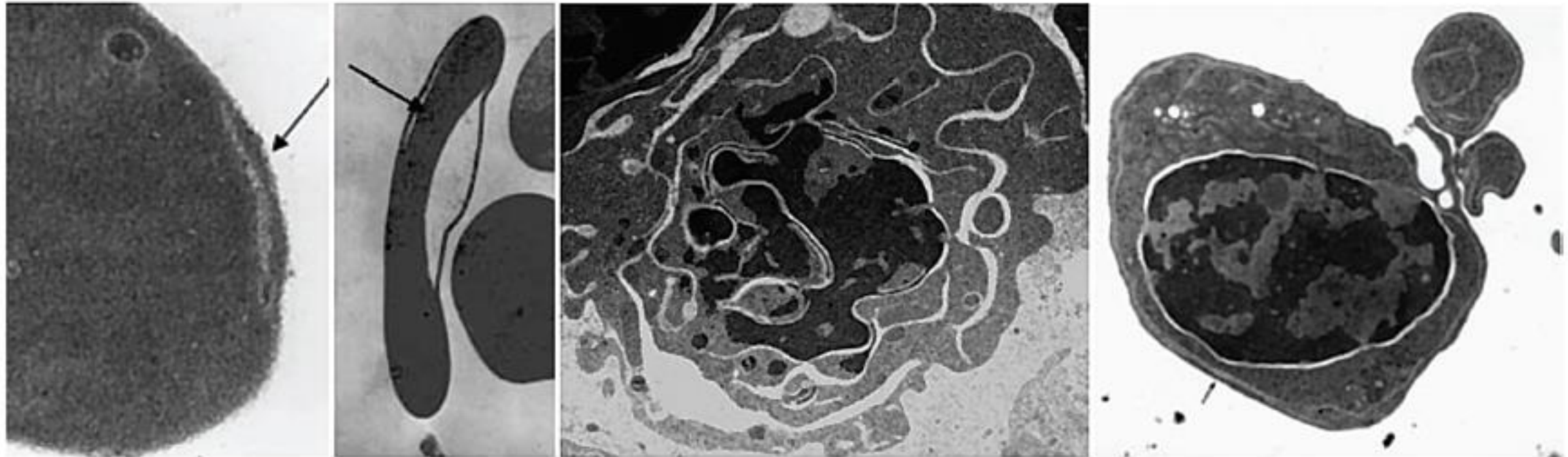
شکل ۲۲-۳۹: مورفولوژی سلول‌های CDA-II که عمدتاً از نورموبلاست‌های دو یا سه هسته‌ای و بدون منظره مگالوئید تشکیل شده‌اند. پل‌های کروماتینی بین هسته‌ای نیز برخلاف CDA-I بسیار نادر و کمیاب هستند. در این نوع CDA برخلاف CDA-III نورموبلاست‌های بیش از ۵ لوبول به ندرت مشاهده می‌شوند. در تمامی اسلایدها هیپرپلازی اریتروئیدی مشهود است.



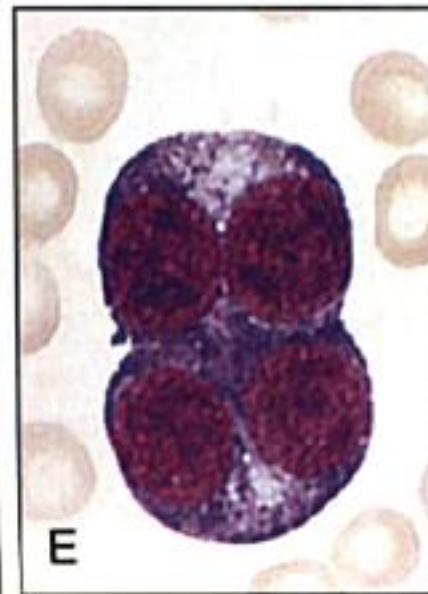
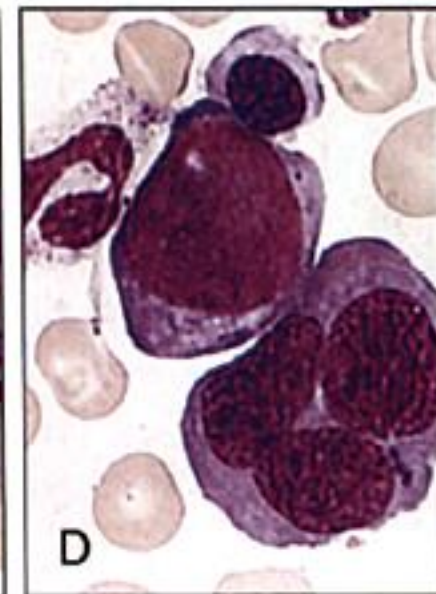
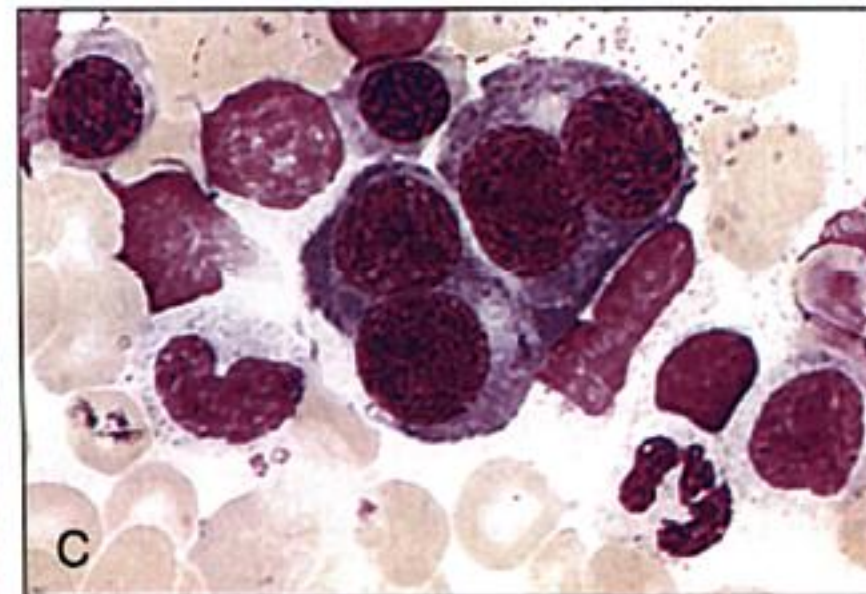
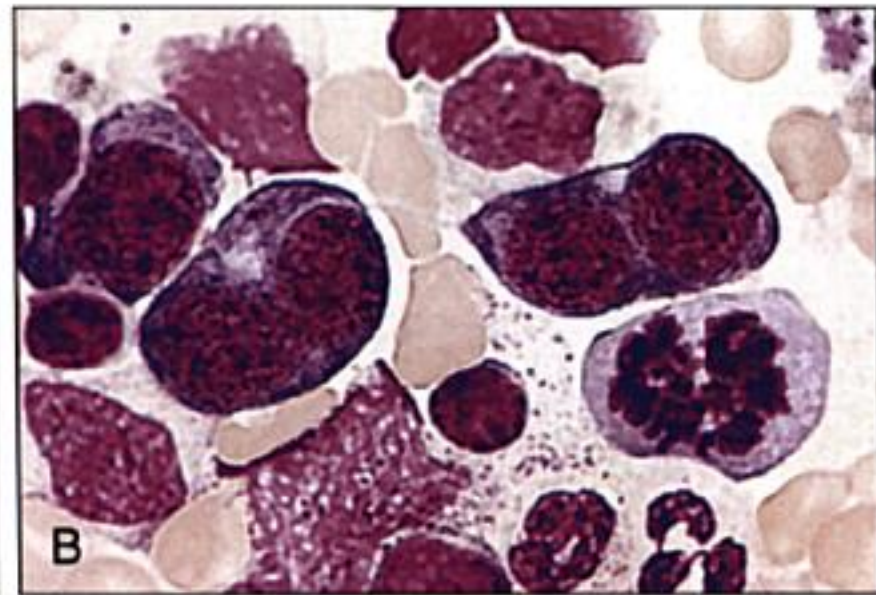
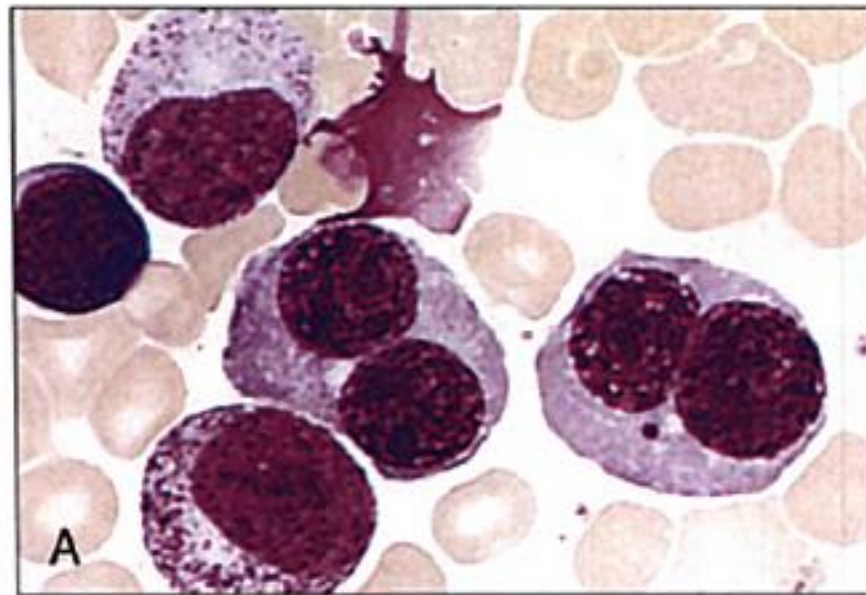
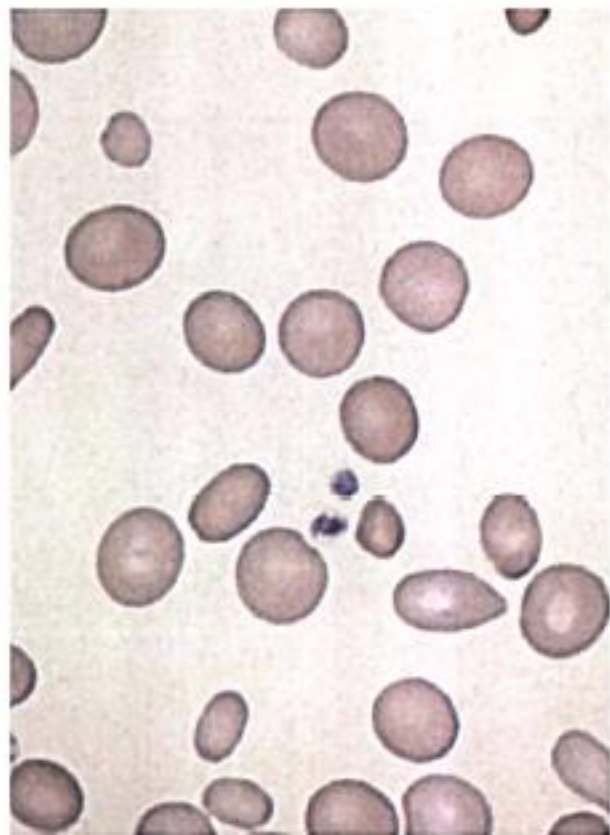
شکل ۲۳-۳۹: چند هستگی و درجانی از کاریورکسی در PcNB و OcNB های CDA-II (میزان دوهسته‌ای بودن نورموبلاست‌ها در CDA-II حدود ۴۰-۱۰٪ در برابر ۷-۵٪ CDA-I می‌باشد).



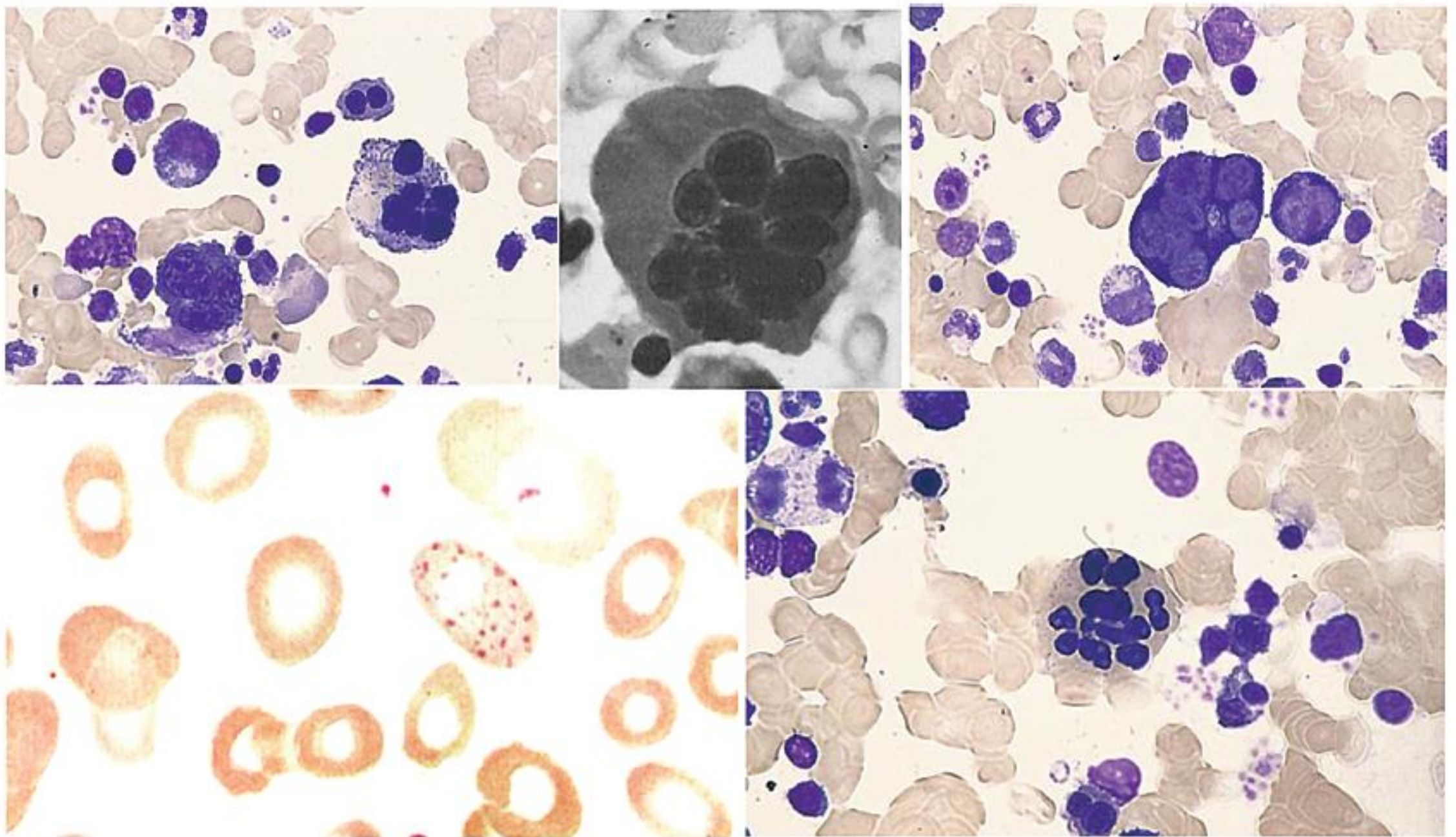
شکل ۲۴-۳۹: گسترش شبکه اندوپلاسمی صاف به زیر غشاء سیتوپلاسمی در سلول‌های رده اریتروئیدی بیماران مبتلا به CDA-II که با دو لایه شدن غشاء خارجی همراه می‌باشد.



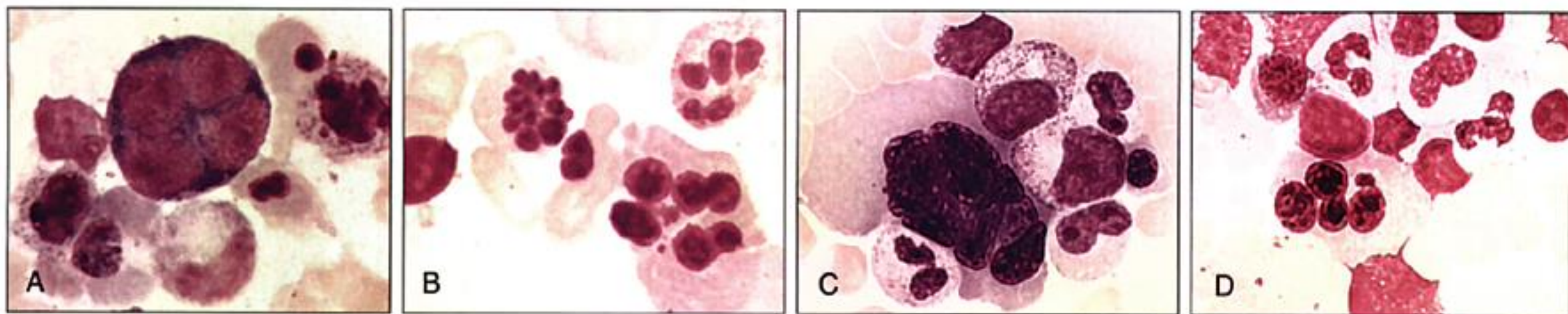
شکل ۲۵-۳۹: دولایه شدن غشاء سیتوپلاسمی (دوبل ممبران) به همراه گشادی فضای بین دو لایه غشاء<sup>۱</sup> در اثر گسترش شبکه ER به زیر غشاء سیتوپلاسمی که هم در نورموبلاست‌های



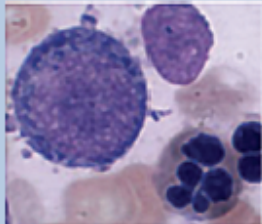
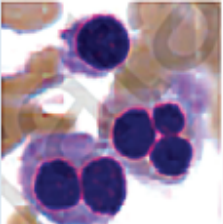
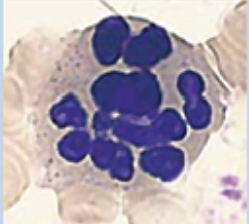
شکل ۲۹-۳۹: نورموبلاست‌های چندهسته‌ای در BM و همچنین آنیزوسیتوز و پوئیکیلوسیتوزیس متوسط در خون محیطی بیمار مبتلا به CDA-II



شکل ۳۰-۳۹: ژیگانتوبلاست‌های چند هسته‌ای بزرگ با بازوفیلیک منقوط و تعداد ۱۲-۷ هسته در BM بیمار مبتلا به CDA-III. خون محیطی بیمار نیز ماکروسیتوزیس، آنیزوسیتوزیس و پوئیکیلوسیتوزیس مشخص و بارزی را نشان می‌دهد.



شکل ۳۱-۳۹: ژیگانتوبلاست‌های چند هسته‌ای بزرگ به همراه کاریورکسی افزایش یافته در بیماری CDA-III

| فصوصیات                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | CDA-I                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | CDA-II یا HEMPAS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | CDA-III                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>- توارث</li> <li>- مکان ژنی</li> <li>- نام ژن معیوب</li> <li>- نوع نقص</li> <li>- خصوصیات اریتروسیت</li> <li>- خصوصیات نورموبلاست</li> <li>- الف) میکروسکوپ نوری</li> <li>- ب) میکروسکوپ الکترونی</li> <li>- سرولوژی</li> <li>- الف) تست هامر</li> <li>- ب) آگلوتیناسیون با آنتی i</li> <li>- الکتروفورز SDS-PAGE</li> <li>- گستره جغرافیایی</li> <li>- اختلالات ساختاری</li> <li>- وضعیت آهن بدن</li> <li>- نوع خونسازی</li> <li>- مورفولوژی سلولی</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>اتوزمال مغلوب</li> <li>15q15.1-15.3</li> <li>ژن کودانین یا CDAN1</li> <li>نقص تشکیل هتروکروماتین و اختلال در منافذ هسته و ورود سیتوپلاسم در هسته</li> <li>ماکروسیتیک</li> <li>مگالوبلاستیک، پل‌های کروماتینی بین هسته‌ای</li> <li>نمای پنیر سوئیسی در هتروکروماتن، گشادی منافذ هسته</li> <li>منفی</li> <li>واکنش قوی/نرمال</li> <li>نرمال</li> <li>نژاد قفقازی، اسرائیلی، لبنانی، ژاپنی</li> <li>اختلالات صورت و اندام‌های فوقانی، دیس‌تاکتیلی</li> <li>اضافه بار آهن</li> <li>غیر موثر</li> <li></li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>اتوزمال مغلوب</li> <li>20q11.2 در ۹۰٪ موارد</li> <li>ژن Sec23B یا CDAN2</li> <li>نقص در تولید و انتقال وزیکول‌های ترشحی گلژی و اختلال گلیکولیزاسیون نورموسیت</li> <li>نورموبلاستیک، غالبیت سلول‌های دوهسته‌ای و چند هسته‌ای</li> <li>غشاء سیتوپلاسمی دو لایه‌ای و تجمع پروتئین‌های باند III در یک سمت غشاء</li> <li>مثبت</li> <li>واکنش قوی</li> <li>نازک و سریع شدن باند III</li> <li>نژاد قفقازی، بویژه ایتالیایی</li> <li>دفرمیتی و زخم انگشتان</li> <li>اضافه بار آهن</li> <li>غیر موثر</li> <li></li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>اتوزمال غالب و همچنین مغلوب</li> <li>15q21-25</li> <li>ژن CDAN3</li> <li>اختلال در تنظیم لوپولاسیون هسته</li> <li>نورموبلاست‌ها</li> <li>ماکروسیت</li> <li>مگالوبلاستیک، ژیگانتوبلاست‌های چند هسته‌ای اریتروئید (تا ۱۲ هسته)</li> <li>چند هستگی شدید و بزرگ</li> <li>منفی</li> <li>واکنش قوی/نرمال</li> <li>سریع شدن خفیف باند III</li> <li>نژاد سوئدی، آمریکایی، آرژانتین</li> <li>ناهنجاری رتینال چشم و نئوپلاسم پلاسماسل</li> <li>اضافه بار آهن</li> <li>موثر</li> <li></li> </ul> |

در تمامی بیماران CDA درجاتی از آنیزوسیتوزیس، پوئیکیلوسیتوزیس، بازوفیلیک منقوط، سلول‌های داکروسیت (قطره اشکی)، N-RBC، اریتروسیت‌های مچاله شده، پلی کرومازیا،

هموسیدروز و چند هستگی نورموبلاست‌ها مشاهده می‌شود.

## روش رنگ آمیزی رتیگولوسیت‌ها:

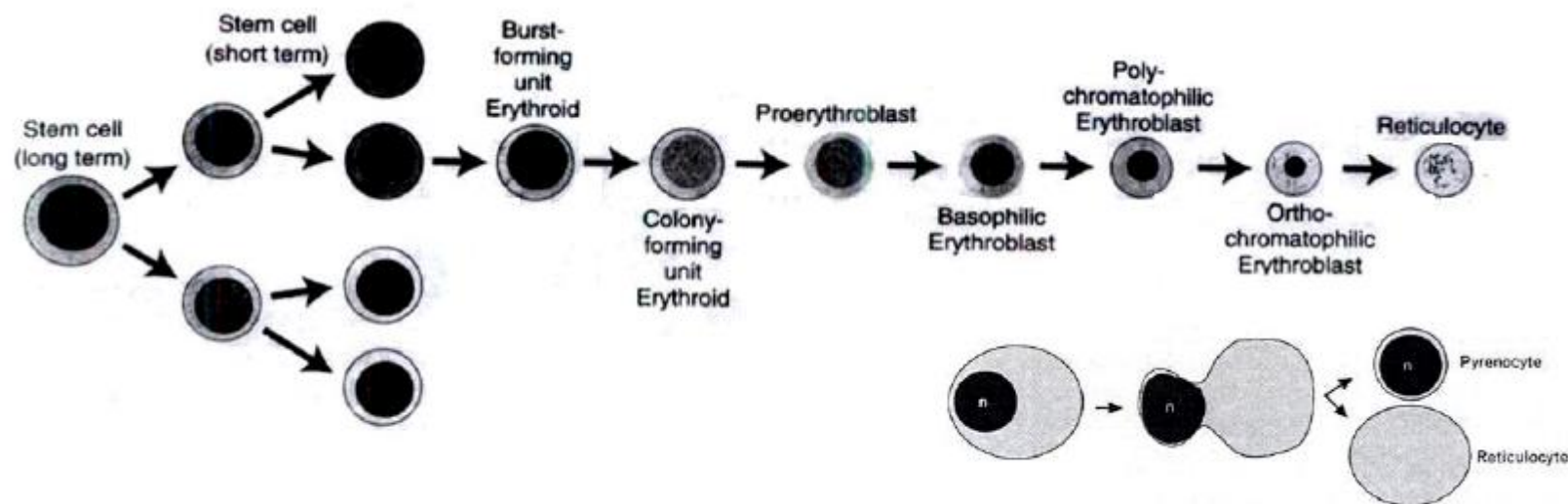
### الف) تهیه رنگ نیومتیلن بلو ۱٪ (NMB):

۱ گرم پودر رنگ NMB را در ۱۰۰ ml بافر فسفات ایزواوسموتیک با  $\text{PH}=6.5$  یا بافر سیتрат سالین حل کرده و بعد از یک ساعت انکوباسیون در دمای  $\text{RT}$ ، محلول را از کاغذ واتمن شماره ۱ عبور داده تا رسوب رنگ موجود در محلول فیلتر شده و آماده مصرف گردد. بقاء این رنگ در دمای اتاق حدود یک ماه بوده و بعد از آن می‌بایست مجدداً به صورت تازه تهیه شود.

برای تهیه بافر فسفات از دو بافر ابتدایی A و B با نسبت ۶۶ به ۳۴ استفاده شده و بعد از تهیه بافر،  $\text{PH}$  آن در ۵/۶ تنظیم می‌شود.

|                                                                          |          |
|--------------------------------------------------------------------------|----------|
| $\text{A}=\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (150mmol/L) | 23.4 g/l |
| $\text{B}=\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (150mmol/L)                           | 21.3 g/l |
| 66 ml A + 34 ml B = iso osmotic phosphat buffer                          |          |

برای تهیه بافر سیترات سالین نیز یک حجم از محلول سیترات سدیم ۳۰ g/L با چهار حجم از محلول نرمال سالین (کلرور سدیم ۹ g/L) مخلوط می‌شود.

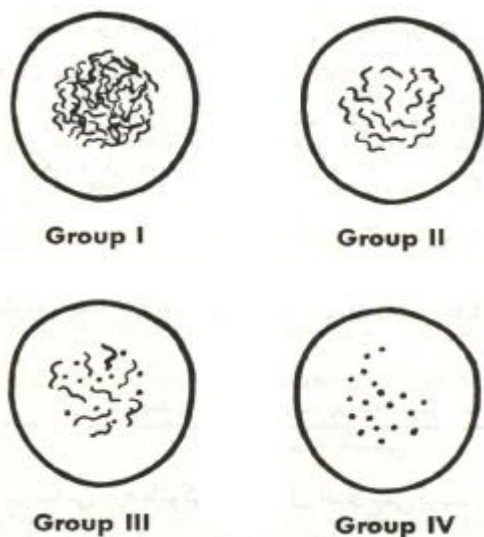


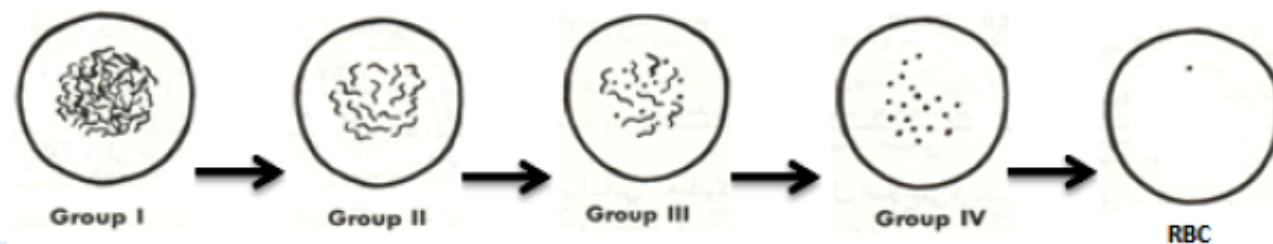
شکل ۱۲-۵: تولید سلول‌های پیرنوسیت و رتیکیلوسیت از سلول اورتوکروماتوفیلیک نورموبلاست که با فاگوسیتوز سلول پیرنوسیت و ورود رتیکیلوسیت به خون محیطی همراه است.

پس از نظر مورفولوژی و شدت نارس بودن سلول، رتیکیلوسیت‌ها به چهار درجه طبقه بندی

می‌شوند:

- رتیکیلوسیت با فیلامنت یا رشته‌های فراوان و متراکم (رتیکیلوسیت تیپ I)
- رتیکیلوسیت با فیلامنت‌های فراوان ولی کمتر متراکم (رتیکیلوسیت تیپ II)
- رتیکیلوسیت با فیلامنت و گرانول‌های متوسط (رتیکیلوسیت تیپ III)
- رتیکیلوسیت با فیلامنت‌های نادر و گرانول‌های زیاد تا کم (رتیکیلوسیت تیپ IV)



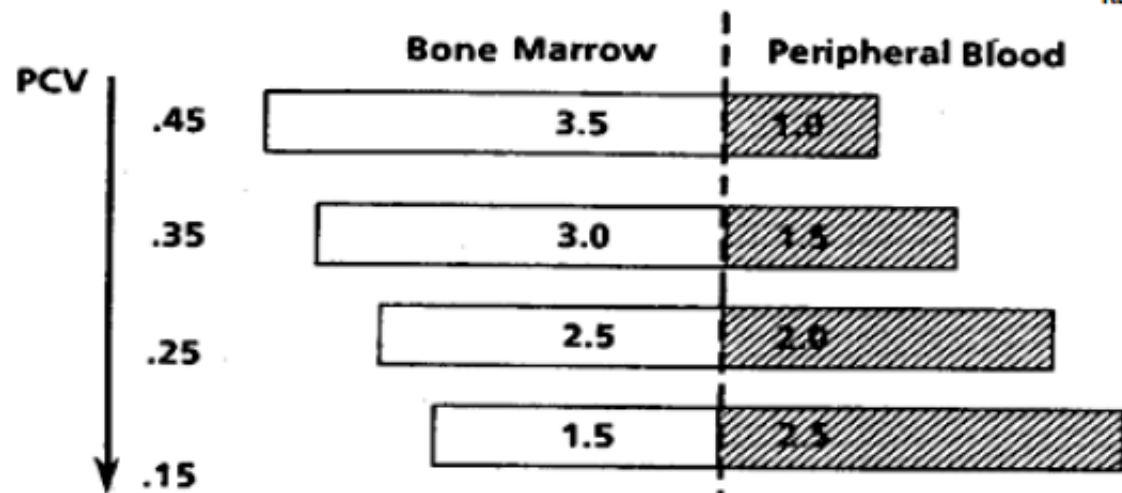


$$RPI = \frac{\text{RET [\%]}}{\text{RET maturation time in blood in days}} \times \frac{\text{HCT [L/L] (patient)}}{0.45 \text{ (standard HCT)}}$$

Example:

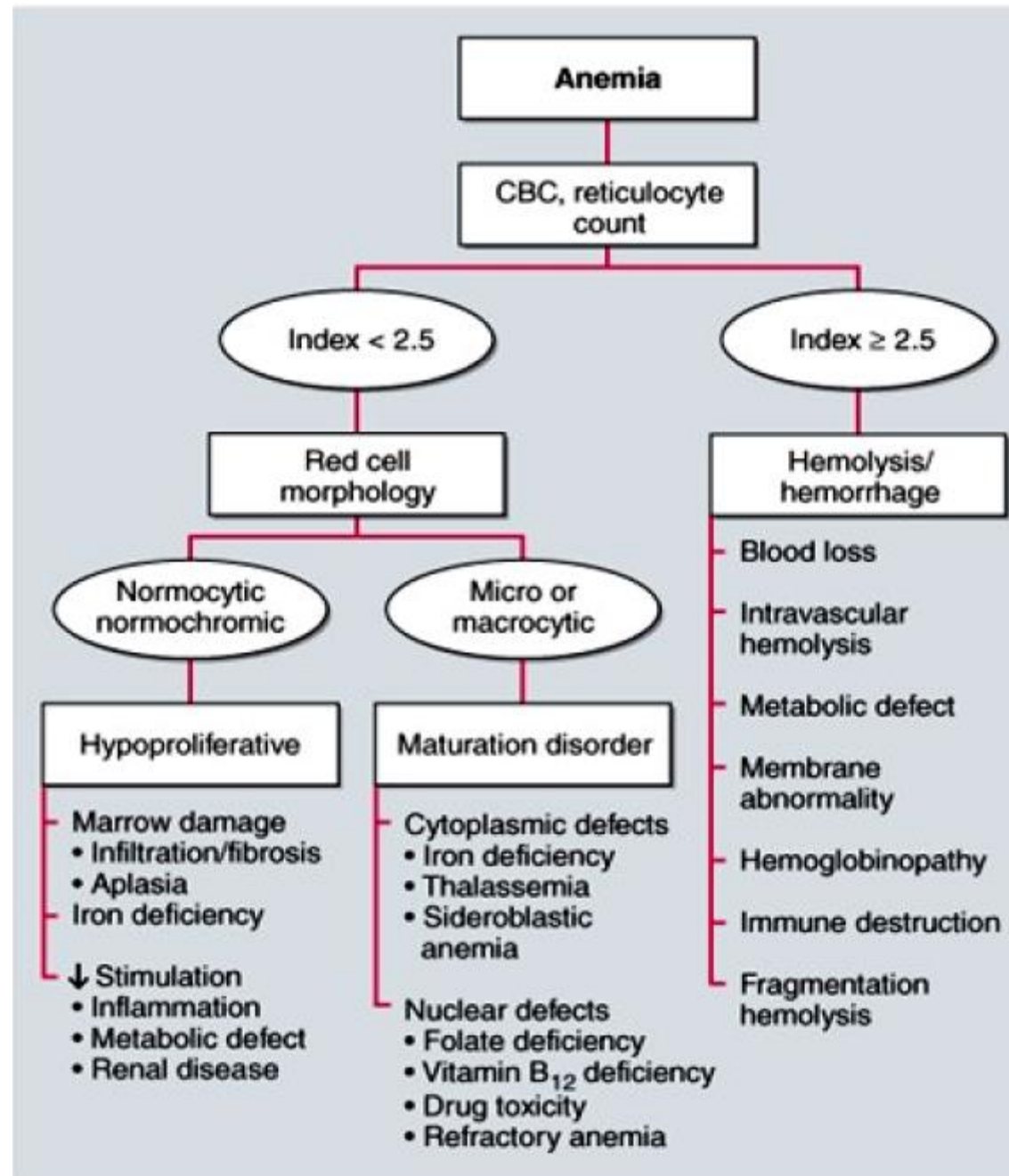
Patient values: HCT= 0.25 L/L, reticulocytes = 20

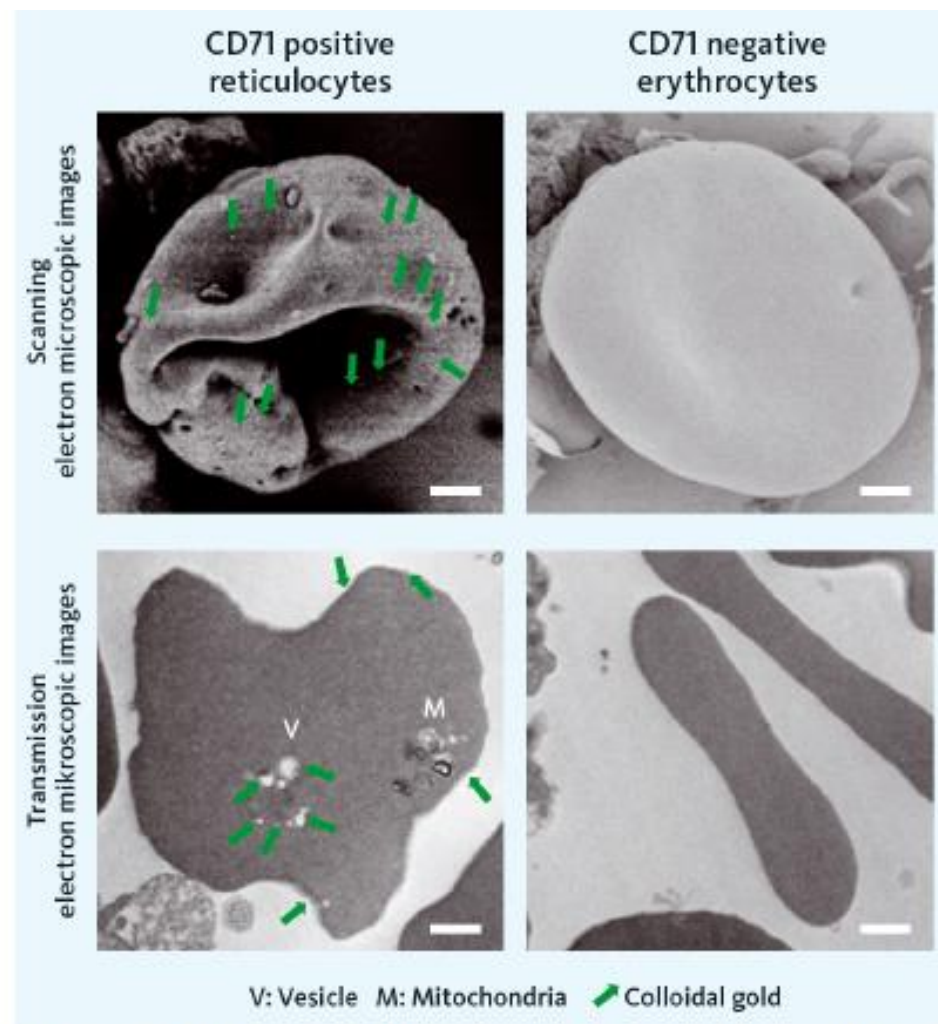
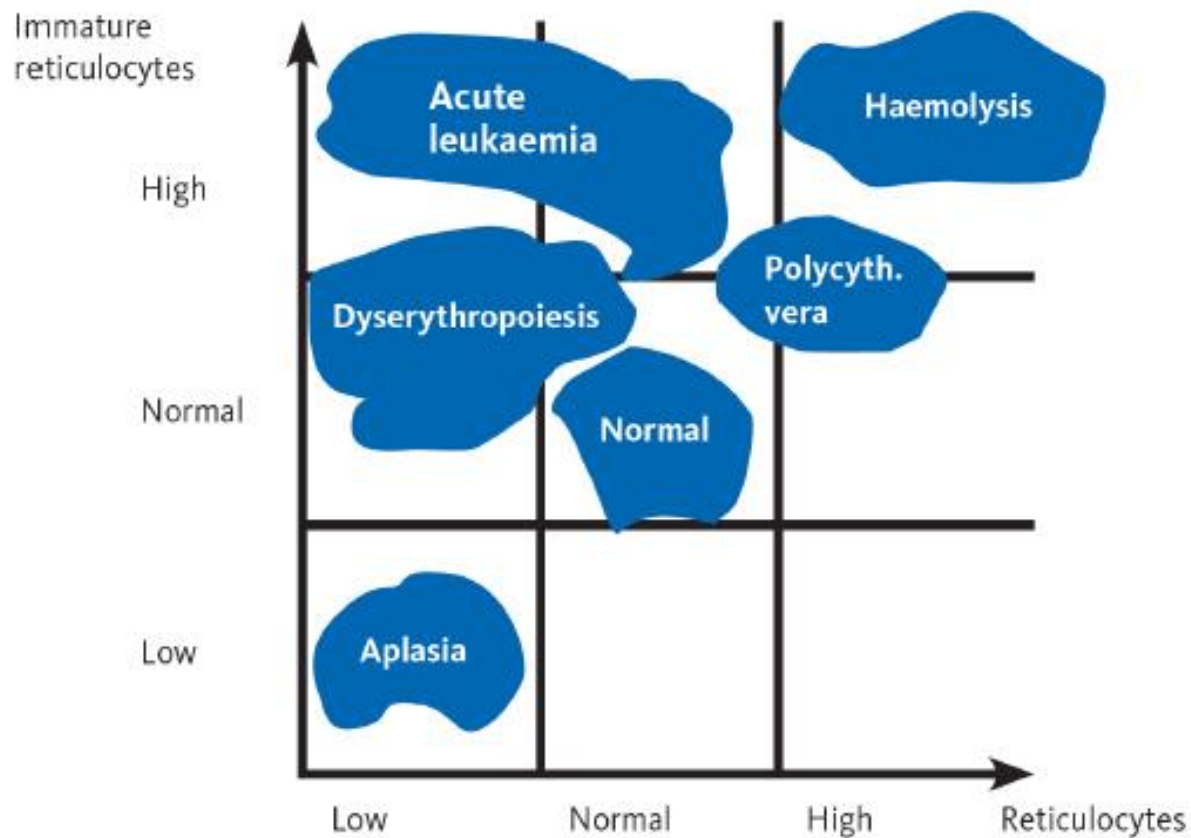
$$RPI = \frac{20 [\%]}{2} \times \frac{0.25}{0.45} = 5.5$$



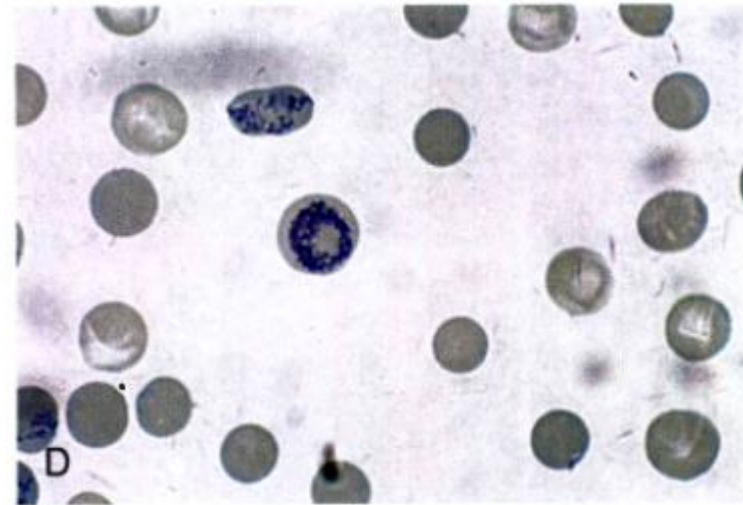
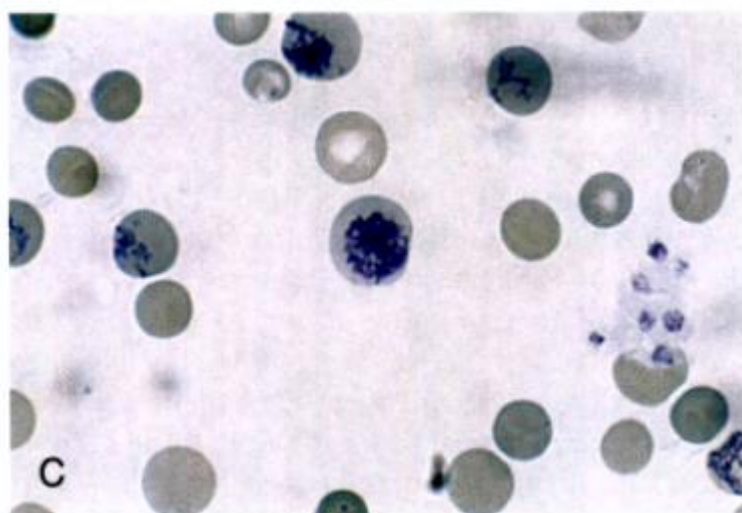
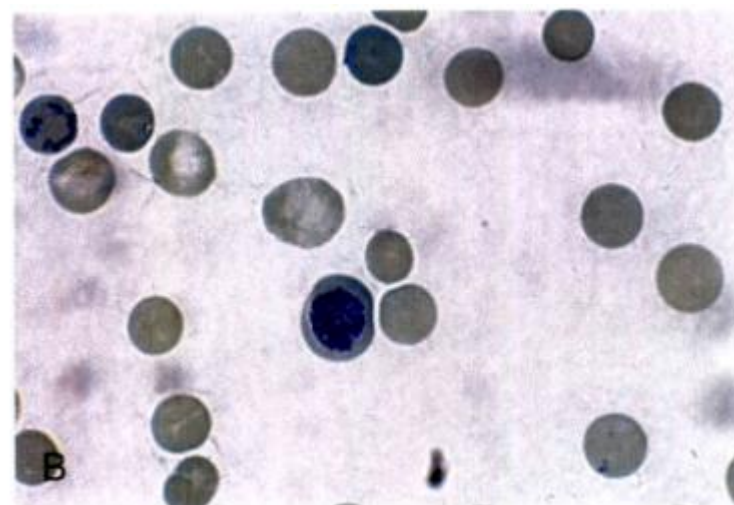
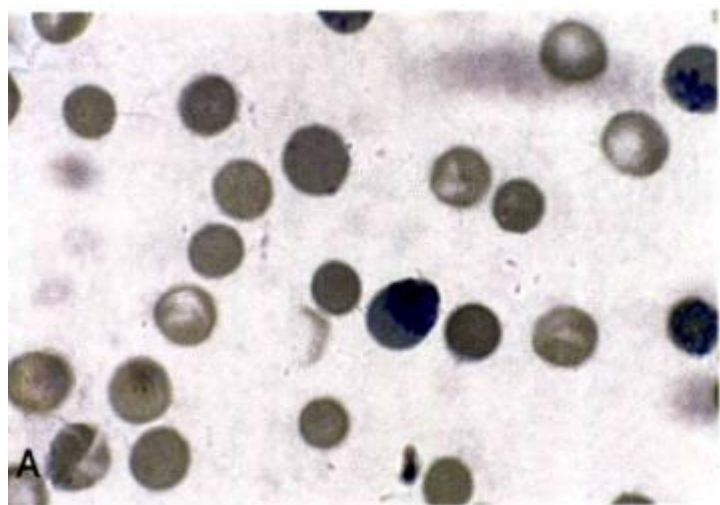
جدول ۱۰-۱۹: مراحل ۴ گانه بلوغ رتیکیلوسیت به همراه فراوانی هر کدام از آنها بر اساس طبقه بندی هیلمایر

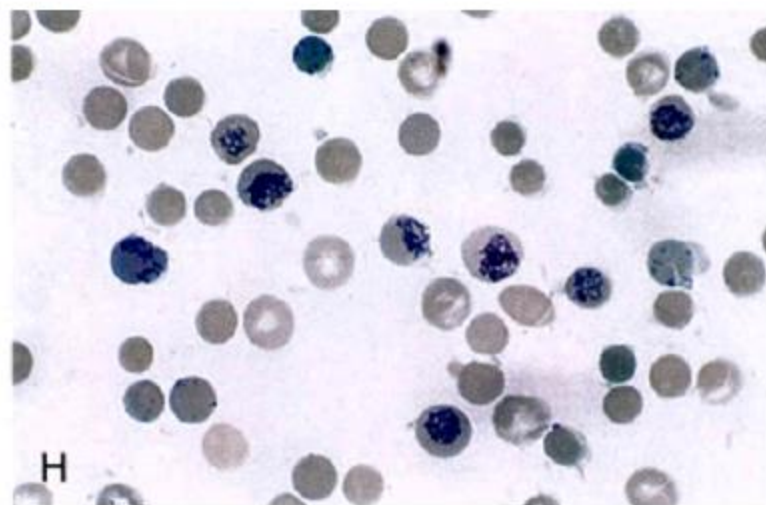
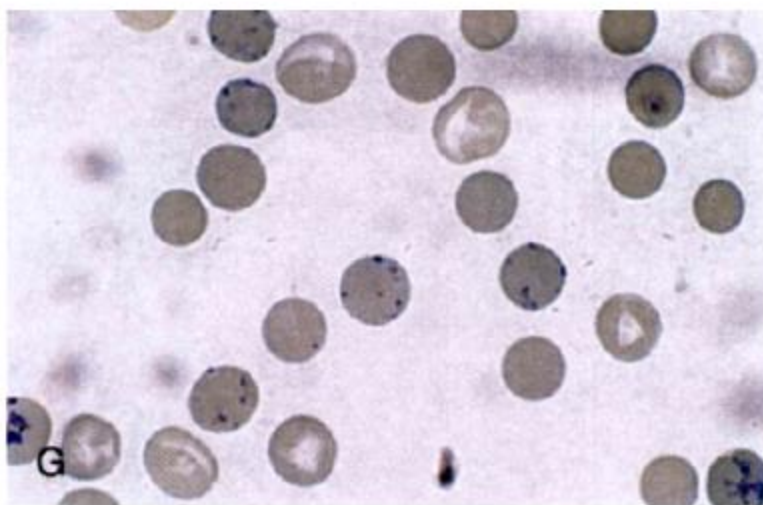
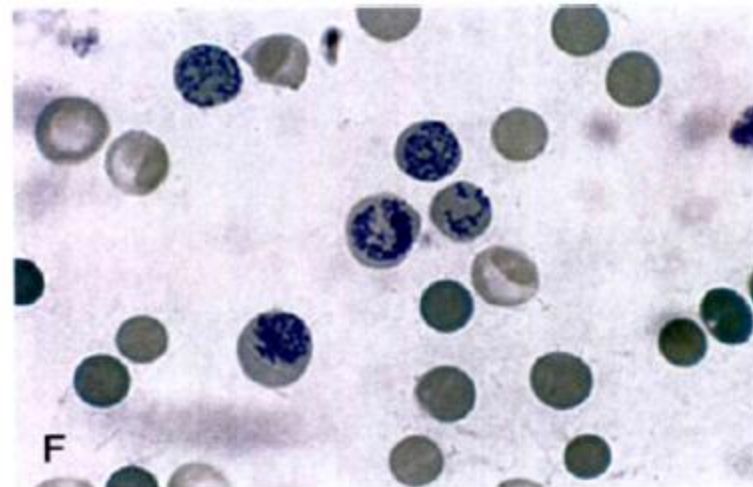
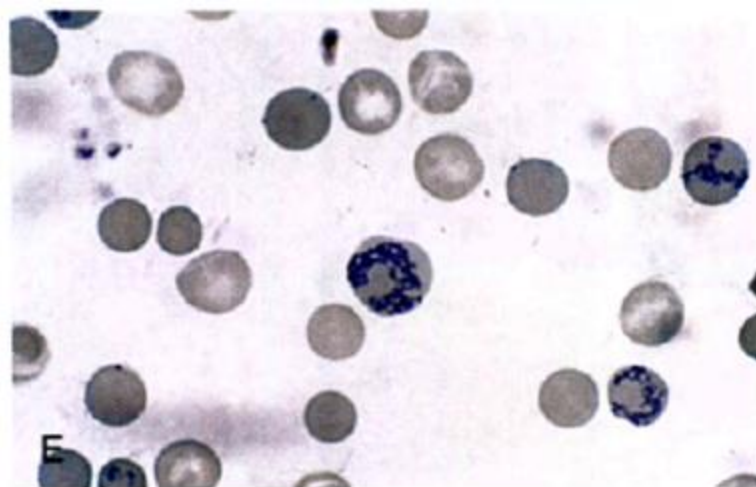
| Maturation stages according to Heilmeyer | Morphological description         | Quantification according to Seip (normal %) |
|------------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------------|
| Stage 0                                  | Nucleus                           |                                             |
| Stage I                                  | Reticulum consists of dense clots | < 0.1                                       |
| Stage II                                 | Loosely arranged reticulum        | 7.0                                         |
| Stage III                                | Diffusely arranged reticulum      | 32.0                                        |
| Stage IV                                 | Some scattered granulae           | 61.0                                        |





شکل ۲۲۰-۱۰: هرچه همزمان با رتیikulوسیتوز، مقدار رتیک‌های نابالغ (مربع بالا-راست) نیز افزایش پیدا کند، احتمال بروز آنمی همولیتیک نیز بالاتر می‌رود. در آنمی آپلاستیک، هم مقدار رتیک و هم انواع نابالغ آن کاهش نشان می‌دهند. از طرفی دیگر در یک لوسمی، مقدار رتیک کاهش می‌یابد ولی در همین تعداد کم، اکثریت آنها نابالغ و رتیکولار می‌باشند. در خون‌سازی غیر موثر علی‌رغم کاهش درصد رتیکوسیت‌ها، درصد انواع نابالغ آنها در حد طبیعی می‌باشد. در پلی‌سایتمی ورا، افزایش نسبی هردوی رتیکولوسیت توتال و نابالغ دیده می‌شود.





شکل ۱۴-۲۷: درجات مختلف ریکتکولوسیتوز که گروه I نابالغ (A,B)، گروه II با بلوغ کم (C,D)، گروه III با بلوغ متوسط (E,F) و گروه IV با بلوغ بالا (G,H) را نشان می‌دهد [۲۰].

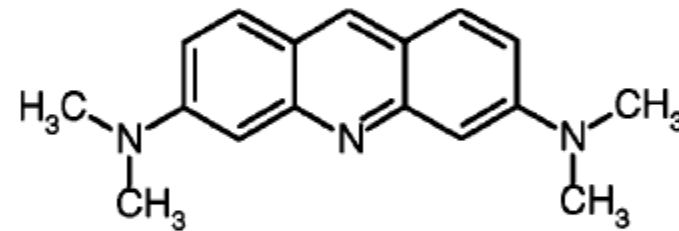
| Reticulocyte count<br>in blood (%) | Number of cells to be counted<br>to achieve a CV of 5% |
|------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| 1                                  | 39,600                                                 |
| 2                                  | 19,600                                                 |
| 5                                  | 7,600                                                  |
| 10                                 | 3,600                                                  |
| 20                                 | 1,600                                                  |
| 50                                 | 400                                                    |

جدول ۴-۲۷: تعداد کلی RBCهایی که می‌بایست در کار با دیسک میلر و در مربع کوچک، برای رسیدن به ضریب تغییرات مختلف ( $\sigma$ ) مثل ۲٪، ۵٪ و ۱۰٪ شمارش شوند [۲۰].

| %Retic    | ضریب تغییرات ۲٪ |          | ضریب تغییرات ۵٪ |          | ضریب تغییرات ۱۰٪ |          | نسبت      |
|-----------|-----------------|----------|-----------------|----------|------------------|----------|-----------|
| RBC تعداد | شمارش میلر      | شمارش کل | شمارش میلر      | شمارش کل | شمارش میلر       | شمارش کل | -         |
| ۱-۲٪      | ۲۷۸۰۰           | ۲۵۰۲۰۰   | ۴۴۰۰            | ۳۹۶۰۰    | ۱۱۰۰             | ۹۹۰۰     | 0.01-0.02 |
| ۳-۵٪      | ۱۳۶۰۰           | ۱۲۲۴۰۰   | ۲۱۸۰            | ۱۹۶۲۰    | ۵۵۰              | ۴۹۵۰     | 0.03-0.05 |
| ۶-۱۰٪     | ۵۲۸۰            | ۴۷۵۲۰    | ۸۴۵             | ۷۶۰۵     | ۲۱۰              | ۱۸۹۰     | 0.06-0.1  |
| ۱۰-۲۰٪    | ۲۵۰۰            | ۲۲۵۰۰    | ۴۰۰             | ۳۶۰۰     | ۱۰۰              | ۹۰۰      | 0.1-0.2   |
| ۲۰-۲۵٪    | ۸۳۵             | ۷۵۱۵     | ۱۳۵             | ۱۲۱۵     | ۳۵               | ۳۱۵      | 0.2-0.25  |

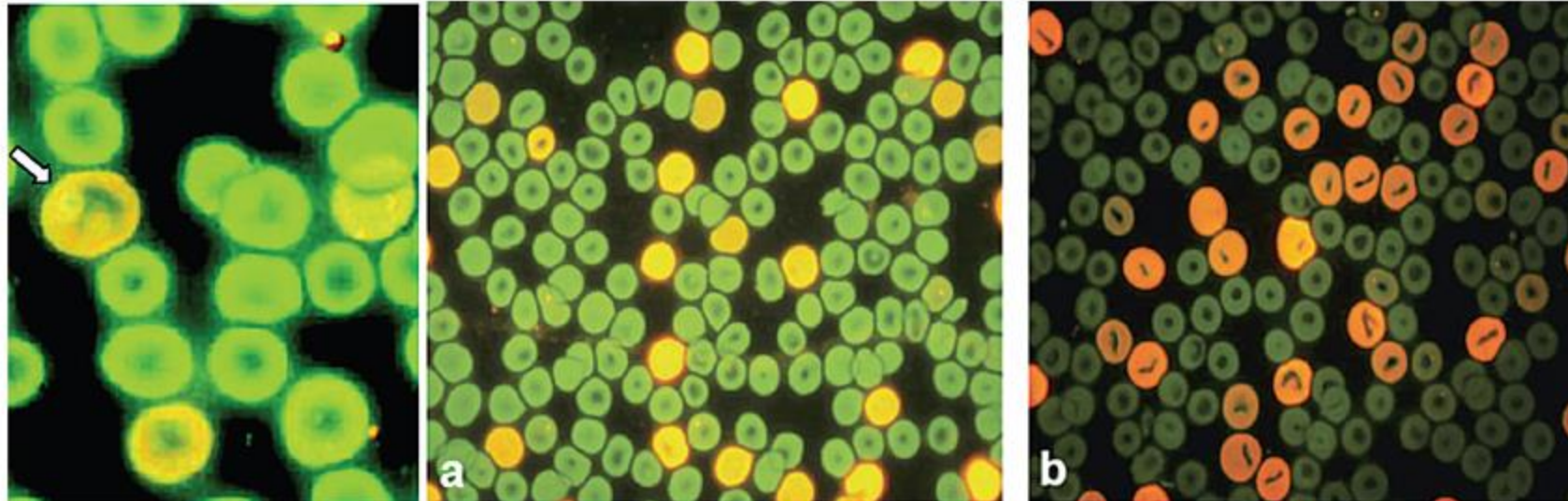
## روش فلورسنت برای رنگ آمیزی و شمارش دستی (رتیکولوسیت‌ها):

امروزه می‌توان از رنگ آکریدین نارنجی<sup>۱</sup> به صورت دستی برای شمارش درصد رتیکولوسیت استفاده کرد. AO رنگ فلورسانت کاتیونیک است که در صورت اتصال به DNA با طول موج ۵۰۲nm تهییج شده و سپس نور فلورسنت سبزی را در طول موج ۵۲۵nm از خود ساطع می‌کند ولی در صورت اتصال به RNA، با طول موج ۴۰۶nm (آبی) تهییج شده و سپس نور فلورسنت قرمز نارنجی را در طول موج ۶۵۰nm ساطع می‌کند، در نتیجه رتیکولوسیت می‌تواند از N-RBC و لوکوسیت‌ها و رسوب رتیک از اجسام هاول ژولی افتراق داده شوند. AO در صورت فاگوسیت شدن و احتباس در لیزوزوم اسیدی نیز با نور آبی تهییج شده و از خود فلورسانت نارنجی ساطع می‌کند، از این رو برای شناسایی سلول‌های آپوپتوتیک از نکروتیک نیز کاربرد دارد.



Acridine Orange

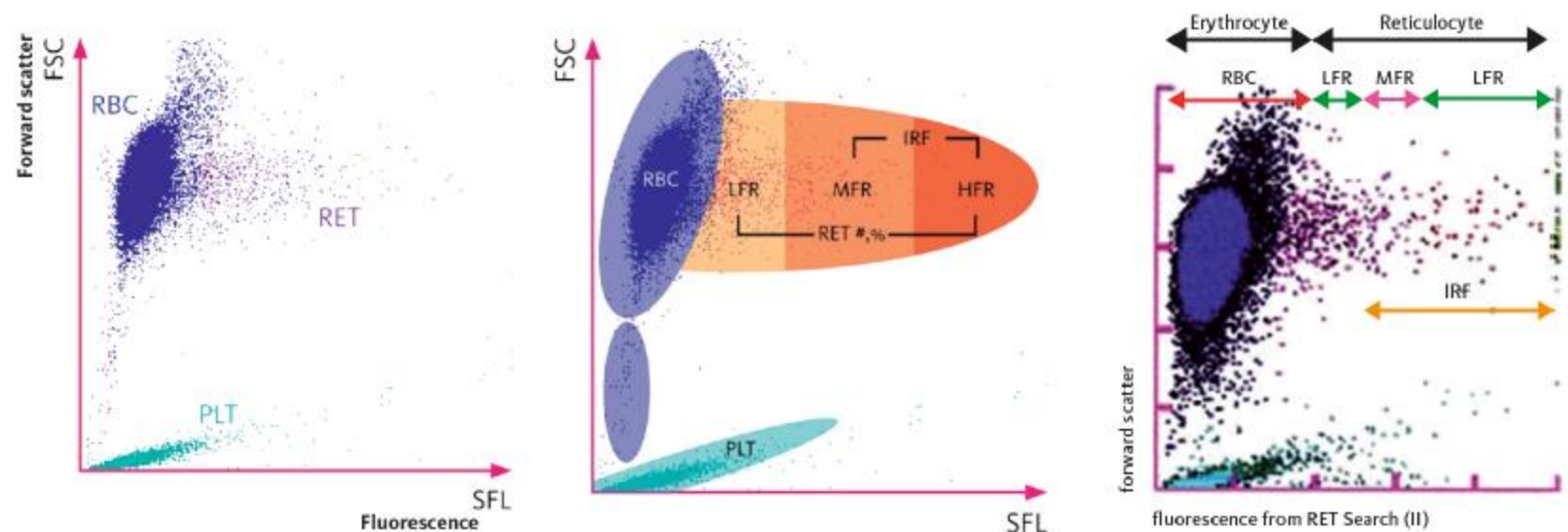
رنگ آمیزی و شمارش رتیکولوسیت‌ها با روش AO به یک وسیله‌های فلورسنت نیاز است که به دلیل قیمت بالا، آن‌ها چندان به صورت روتین انجام



شکل ۲۰-۲۶: رنگ آمیزی رتیکولوسیت‌ها با آکریدین نارنجی (AO) که در آن RBCها به رنگ سبز و رتیکولوسیت‌ها به رنگ قرمز-نارنجی در آمده و با دقت زیادی از همدیگر افتراق داده می‌شوند.

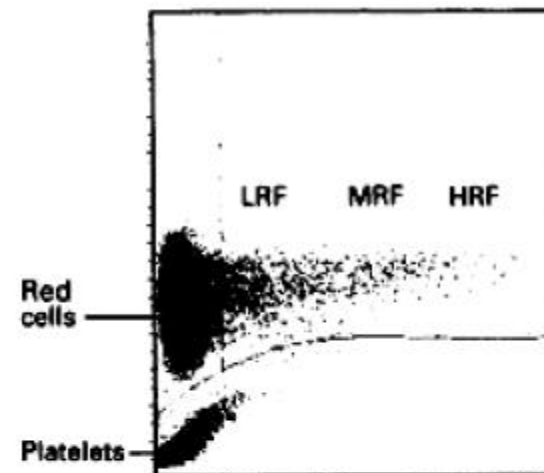
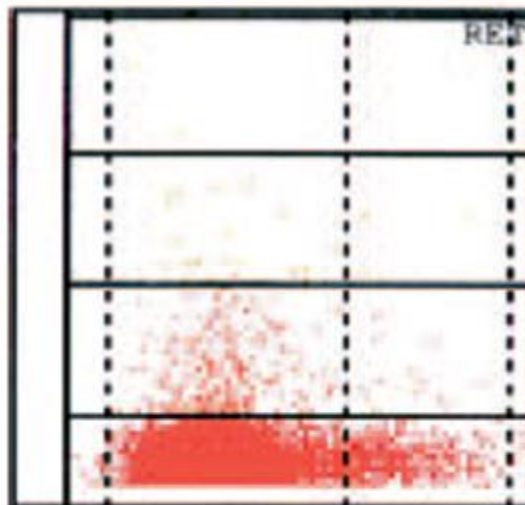
جدول ۲۳-۱۰: مقایسه سه سطح از رتیلولوسیت های LFR، MFR و HFR

| LFR                            | MFR                               | HFR                             |
|--------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| Low-Fluorescence Reticulocytes | Medium-Fluorescence Reticulocytes | High-Fluorescence Reticulocytes |
| Little content of RNA          | Medium content of RNA             | High content of RNA             |
| Mature reticulocytes           | Semi-mature reticulocytes         | Immature reticulocytes          |
| Reference range: 86.5 – 98.5 % | Reference range: 1.5 – 11.5 %     | Reference range: 0 – 1.4 %      |



شکل ۲۱۶-۱۰: هرچه رتیلولوسیت ها نابالغ تر باشند، به دلیل داشتن مقادیر بالای RNA رنگ فلورسنت بیشتری جذب کرده و لذا میل بالایی به سمت راست پیدا می کنند که به رتیلولوسیت های نابالغ تیپ I و II عبارت HFR، به رتیلولوسیت های تیپ III عبارت MFR و به رتیلولوسیت های بالغ تر تیپ IV نیز عبارت LFR استفاده می شود. به مجموع رتیلولوسیت های نابالغ I تا III (مقدار ۱۵/۹- ۱/۱ کل رتیلولوسیت ها) نیز فراکسیون رتیلولوسیت های نابالغ یا IRF گفته می شود که اغلب CD71+ نیز می باشند.

| Normal Range |           |
|--------------|-----------|
| RET          | 0.5-2     |
| LFR          | 86.5-98.5 |
| MFR          | 1.5-11.3  |
| HFR          | 0-1.4     |
| IRF          | 1.1-15.9  |

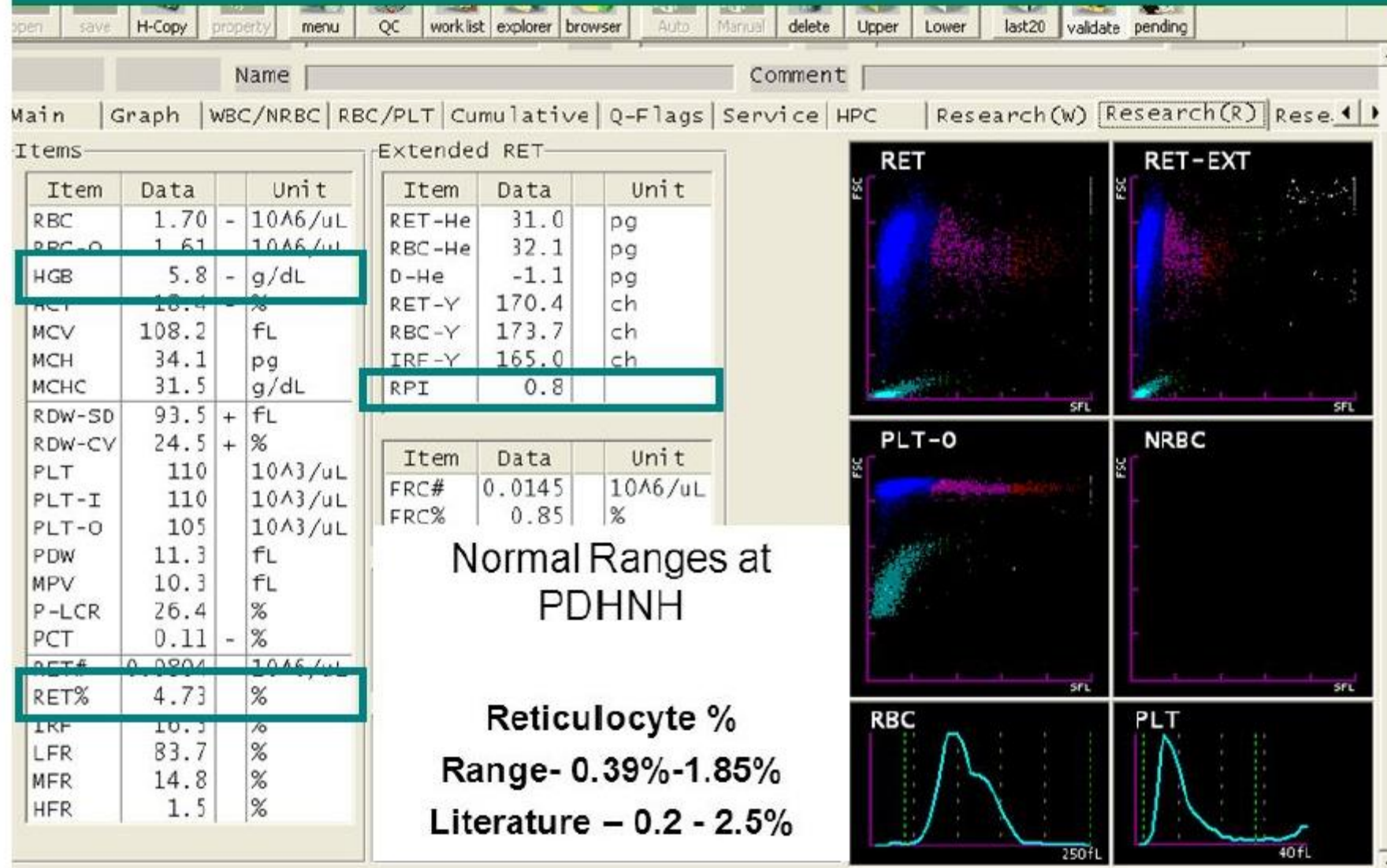


NO. 596925 15 : 46

+RET % 11.52 [%]  
+RET # 299.5 [ $\times 10^3 / L$ ]  
-RBC 2.60 [ $\times 10^{12} / L$ ]  
-LFR 66.0 [%]  
+MFR 25.7 [%]  
+HFR 8.3 [%]  
PLT DISCRIMINATION ERROR

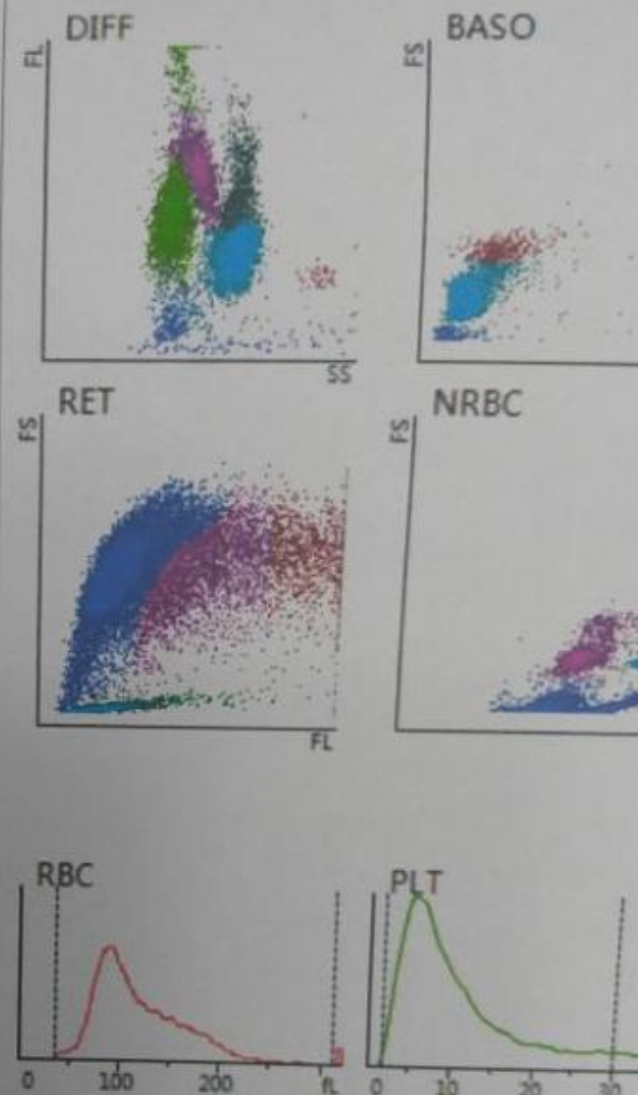
شکل ۲۱۸-۱۰: تصویر سمت راست: سیتوگرام رتیikulوسیت یک سیکسکس R-3000 (تصویر بالا) که در آن رتیikulوسیت‌های بسیار نارس با میزان فلورسنت بالا (HFR)، رتیikulوسیت‌های رسیده و بالغ با میزان فلورسنت پایین (LRF) و موارد حد وسط آنها (MRF) نشان داده شده است. HFRها (سمت راست سیتوگرام) معادل رتیikulوسیت‌های تیپ I و II و LFRها معادل رتیikulوسیت‌های تیپ IV بوده و شمارش آنها می‌تواند برآورد دقیقی از مقدار RPI باشد. تصویر سمت چپ: سیتوگرام رتیikulوسیت در سل کانتر Pentra-120R که سه سطح HFR، MRF و LRF را نشان می‌دهد. رتیikulوسیت‌ها بسته به شدت نارس بودن خود رنگ‌پذیری بیشتری داشته و لذا در سمت بالاتری از سیتوگرام قرار می‌گیرند.

## Hb- 5.8 , Retic – 4.73%



شکل ۲۲۳-۱: محاسبه انوماتیک RPI توسط سل کانترهای سیستم بر اساس HCT و RET%

| Para.     | Result | Unit                      | Ref. Ranges      |
|-----------|--------|---------------------------|------------------|
| 1 WBC     | 13.50  | $\times 10^3/\mu\text{L}$ | 3.20 - 11.50     |
| 2 Neu#    | 9.85   | $\times 10^3/\mu\text{L}$ | 2.00 - 7.70      |
| 3 Lym#    | 1.67   | $\times 10^3/\mu\text{L}$ | 1.00 - 3.00      |
| 4 Mon#    | 1.55   | $\times 10^3/\mu\text{L}$ | 0.20 - 0.60      |
| 5 Eos#    | 0.07   | $\times 10^3/\mu\text{L}$ | 0.06 - 0.50      |
| 6 Bas#    | 0.36   | $\times 10^3/\mu\text{L}$ | 0.01 - 0.30      |
| 7 Neu%    | 72.9   | %                         | 43.0 - 78.0      |
| 8 Lym%    | 12.4   | %                         | 15.0 - 45.0      |
| 9 Mon%    | 11.5   | %                         | 4.0 - 9.0        |
| 10 Eos%   | 0.5    | %                         | 1.0 - 7.0        |
| 11 Bas%   | 2.7    | %                         | 0.0 - 1.0        |
| 12 RBC    | 1.32   | $\times 10^{12}/\text{L}$ | 3.40 - 5.40      |
| 13 HGB    | 4.4    | g/dL                      | 10.5 - 16.6      |
| 14 HCT    | 14.7   | %                         | 31.0 - 48.0      |
| 15 MCV    | 111.9  | fL                        | 79.0 - 100.0     |
| 16 MCH    | 33.6   | pg                        | 27.6 - 35.0      |
| 17 MCHC   | 30.0   | g/dL                      | 31.0 - 36.0      |
| 18 RDW-CV | 35.3   | %                         | 11.5 - 15.5      |
| 19 RDW-SD | 143.2  | fL                        | 40.0 - 61.0      |
| 20 PLT    | 93     | $\times 10^9/\text{L}$    | 145 - 440        |
| 21 MPV    | ****   | fL                        | 6.5 - 12.0       |
| 22 PDW    | ****   |                           | 15.0 - 17.0      |
| 23 PCT    | ****   | %                         | 0.108 - 0.282    |
| 24 P-LCC  | ****   | $\times 10^9/\text{L}$    | 30 - 90          |
| 25 P-LCR  | ****   | %                         | 11.0 - 45.0      |
| 26 RET#   | 0.2377 | $\times 10^{12}/\text{L}$ | 0.0200 - 0.2000  |
| 27 RET%   | 18.03  | %                         | 0.30 - 3.00      |
| 28 IRF    | 35.9   | %                         | 0.0 - 25.0       |
| 29 LFR    | 64.1   | %                         | 80.0 - 100.0     |
| 30 MFR    | 21.6   | %                         | 0.0 - 20.0       |
| 31 HFR    | 14.3   | %                         | 0.0 - 5.0        |
| 32 NRBC#  | 1.996  | $\times 10^3/\mu\text{L}$ | 0.000 - 9999.999 |
| 33 NRBC%  | 14.79  | /100WBC                   | 0.00 - 9999.99   |
| 34 IMG#   | 1.11   | $\times 10^9/\text{L}$    | 0.00 - ...       |
| 35 IMG%   | 0.082  | %                         | 0.000 - 1.000    |
| 36 IPF    | 5.6    | %                         | 0.9 - 10.0       |
| 37 RHE    | 28.5   | pg                        | 28.0 - 37.0      |



| Morphology Grading Table     |        |        |         |
|------------------------------|--------|--------|---------|
| Cell Name                    | Few/1+ | Mod/2+ | Many/3+ |
| Schistocytes                 | <1 %   | 1–2    | >2      |
| Sickle cells                 | N/A    | 1–2    | >2      |
| Bite cells                   | N/A    | 1–2    | >2      |
| Blister cells                | N/A    | 1–2    | >2      |
| Irregularly contracted cells | N/A    | 1–2    | >2      |
| Howell-Jolly bodies          | N/A    | 2–3    | >3      |
| Pappenheimer bodies          | N/A    | 2–3    | >3      |
| Oval macrocytes              | N/A    | 2–5    | >5      |
| Polychromasia                | N/A    | 5–20   | >20     |
| Acanthocytes                 | N/A    | 5–20   | >20     |
| Echinocytes                  | N/A    | 5–20   | >20     |
| Elliptocytes                 | N/A    | 5–20   | >20     |
| Ovalocytes                   | N/A    | 5–20   | >20     |
| Spherocytes                  | N/A    | 5–20   | >20     |
| Stomatocytes                 | N/A    | 5–20   | >20     |
| Target cells                 | N/A    | 5–20   | >20     |
| Teardrop cells               | N/A    | 5–20   | >20     |
| Basophilic stippling         | N/A    | 5–20   | >20     |
| Anisocytosis                 | N/A    | 11–20  | >20     |
| Macrocytes                   | N/A    | 11–20  | >20     |
| Microcytes                   | N/A    | 11–20  | >20     |
| Hypochromic cells            | N/A    | 11–20  | >20     |

| Morphology Grading Table      |        |        |         |
|-------------------------------|--------|--------|---------|
| Cell Name                     | Few/1+ | Mod/2+ | Many/3+ |
| WBC                           |        |        |         |
| Döhle bodies                  | N/A    | 2–4    | >4      |
| Vacuolation (neutrophil)      | N/A    | 4–8    | >8      |
| Hypogranulation (neutrophil)  | N/A    | 4–8    | >8      |
| Hypergranulation (neutrophil) | N/A    | 4–8    | >8      |
| Platelets                     |        |        |         |
| Giant Platelets               | N/A    | 11–20  | >20     |

